

DIE REDUKTION
VON AMITRIPTYLIN-N-OXID
ZU AMITRIPTYLIN
IN MENSCHLICHEM BLUT
IN VITRO

Norbert Sassim

Diss.
München
1984

Aus der Psychiatrischen Klinik der Universität München

Direktor: Prof. Dr. H. Hippus

D I E R E D U K T I O N V O N
A M I T R I P T Y L I N - N - O X I D
Z U A M I T R I P T Y L I N
I N M E N S C H L I C H E M B L U T
I N V I T R O

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
NORBERT SASSIM

aus
Augsburg

Jahr
1984

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. N. Matussek

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. Hippius

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 8. November 1984

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

V O R W O R T

Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Experimente wurden seit Ende 1980 - in einem Zeitraum von knapp zwei Jahren - in der Neurochemischen Abteilung der Psychiatrischen Klinik der Universität München durchgeführt.

Dem Leiter der Abteilung, Herrn Prof. Dr. med. N. Matussek danke ich für die Stellung des Themas und das Interesse, das er der Arbeit entgegenbrachte.

Mein Dank gilt auch allen Mitarbeitern der Abteilung und der Klinik, deren Hilfe ich in Anspruch nahm, insbesondere Herrn Dr. rer. nat. H.-J. Kuß.

Darüberhinaus bin ich Frau Prof. Dr. U. Breyer-Pfaff vom Institut für Toxikologie der Universität Tübingen für anregende Kritik zu Dank verpflichtet.

München und Augsburg
im April 1984

Norbert Sassim



Digitized by the Internet Archive
in 2026

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

VORWORT.....	3
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	9
EINLEITUNG.....	11
PROBLEMSTELLUNG UND ZIEL DER ARBEIT.....	19
MATERIALIEN UND METHODEN.....	21
E r g e b n i s s e	27
V E R S U C H E Z U R M E T H O D I K.....	29
A.) Antikoagulation mit Heparin oder EDTA.....	29
B.) Die Bedeutung der Alkalisierung des Inkubations- ansatzes für die Extraktionsausbeute.....	32
V E R S U C H E Z U R P R O B L E M S T E L L U N G..	39
I EXPERIMENTE MIT HÄMOLYSAT.....	39
1.) Ort der N-Oxid-Reduktion.....	39
2.) Die Reaktionsgeschwindigkeit.....	43
3.) Interindividuelle Unterschiede.....	46
4.) Der Einfluß der HämolySATmenge.....	51

5.) Der Einfluß der Amitriptylin-N-Oxid-Menge.....	54
6.) Der Einfluß der Temperatur.....	57
7.) Der Einfluß des pH-Wertes.....	60
8.) Der Einfluß chemisch verwandter Pharmaka.....	63
9.) - 11.) V e r d ü n n u n g e n.....	67
9.1.) Verdünnung von Hämolysat mit H ₂ O.....	67
9.2.) Verdünnung von Hämolysat mit HCl, NaOH und Blut-Plasma.....	72
10.) Der Einfluß zugegebenen Plasmas.....	81
11.) Schrittweiser Ersatz von Hämolysat durch Blut-Plasma.....	91

II

EXPERIMENTE MIT INTAKTEN ERYTHROCYTEN..... 95

Allgemeine Ergebnisse der Experimente mit intakten Erythrocyten.....	97
---	----

12.) Interindividuelle Variabilität und Unterschiede zwischen verschiedenen N-Oxiden innerhalb eines Experimentes.....	105
--	-----

13.) Vergleich: Erythrocyten in Blut-Plasma - - Erythrocyten in Puffer.....	114
Weitere Versuche mit Erythrocyten in Puffer.....	117

14.) Stufenweise Verdünnung des Plasmas mit PBS-Puffer und H ₂ O und Verdünnung von PBS-Puffer mit H ₂ O.....	123
---	-----

15.) Verteilung der Gesamtsubstanz sowie endogenen und exogenen Amitriptylins in Vollblut und in Erythrocyten-Puffer-Suspensionen.....	130
--	-----

16.) Temperatur- und Zeitabhängigkeit des Pharmakoneinstroms in die Erythrocyten bei zwei verschiedenen N-Oxiden.....	138
---	-----

III	EXPERIMENTE MIT PHARMAKONTRANSPORT AUS DEN ERYTHROCYTEN IN DAS UMGEBENDE MEDIUM.....	147
17.)	Vergleich: Pharmakontransport aus dem Plasma in die Erythrocyten - Pharmakontransport aus den Erythrocyten ins Plasma.....	149
18.)	Die Bedeutung des Mediums für den Pharmakontransport in die Erythrocyten hinein bzw. aus ihnen heraus.....	158
19.)	Pharmakontransport aus den Erythrocyten in das Medium in zwei Schritten.....	171
20.)	Zeit- und Temperaturabhängigkeit des Pharmakontransportes aus den Erythrocyten in das Medium.....	183
IV	EXPERIMENTE MIT PLASMA-INKUBATION.....	195
21.)	Amitriptylin im Plasma nach Inkubationen von Vollblut bzw. Plasma mit Amitriptylin-N-Oxid.....	195
DISKUSSION.....		205
ZUSAMMENFASSUNG.....		227
LITERATURVERZEICHNIS.....		231
ANHANG (TABELLENWERK).....		235
LEBENS LAUF.....		311

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

In Text, Abbildungen und Tabellen werden folgende Abkürzungen verwendet :

Ax : Amitriptylin-N-Oxid

At : Amitriptylin

Nt : Nortriptylin

Ix : Imipramin-N-Oxid

Im : Imipramin

DmI : Desmethyl-Imipramin

Cx : Chlorimipramin-N-Oxid

Cl : Chlorimipramin

DC : Desmethyl-Chlorimipramin

E(rys): Erythrocyten

Pl : Blut-Plasma

Pf : Puffer (PBS-Puffer: phosphat buffer solution)
(plasmaisoton, pH 7,4)

V. : Versuch

Abb. : Abbildung

Tab. : Tabelle

Weitere, nur in einzelnen Abbildungen verwendete Abkürzungen, werden bei der jeweiligen Abbildung erklärt.

E I N L E I T U N G

Das tricyclische Antidepressivum Amitriptylin-N-Oxid * (Ax) ist chemisch ein Dibenzocycloheptadien.

Es tritt in geringen Mengen als Nebenprodukt im Metabolismus des Amitriptylins ** (At) auf, des heute in Deutschland am meisten verwendeten Thymoleptikums. Nach oraler Gabe von Amitriptylin läßt sich ca. 1 % der Dosis als N-Oxid im Urin eines Probanden nachweisen (23).

Eine derartige N-Oxid-Bildung wurde bei mehreren Pharmaka gefunden, und es wurden Versuche unternommen, um Einblick in die Bildung und den Abbau von N-Oxiden zu gewinnen (1, 2, 4, 7, 18). Häufig kam dabei Imipramin bzw. dessen N-Oxid zum Einsatz, welches dem Amitriptylin-N-Oxid in Struktur, Wirkungsweise und Metabolismus nahe verwandt ist (zumindest soweit es für die antidepressive Wirkung von Belang ist).

1969 wurde von BICKEL eine zusammenfassende Darstellung über Vorkommen, Biochemie, Pharmakologie und Metabolismus der wichtigsten N-Oxide gegeben und die pharmakologische Bedeutung dieser Stoffgruppe betont (3).

Als man erkannte, daß sich durch die Verabreichung der N-Oxide tricyclischer Psychopharmaka der gleiche therapeutische Erfolg erzielen läßt wie mit den tertiären Aminen selbst (22) und dabei weniger unerwünschte Nebenwirkungen auftreten (22) nahm das Interesse an diesen Substanzen stark zu (z.B.: 1, 2, 3, 4, 7).

* Handelsname: Equilibrin

** Handelsname: Saroten, Laroxyl, Tryptizol

Ergebnisse der klinischen Prüfung von Amitriptylin-N-Oxid (nach KANIG und TULUWEIT, 11)

Neben dem vorherrschenden antidepressiven Effekt entfaltet das Pharmakon auch eine tranquillisierende, sedierende und anxiolytische Wirkung. Es eignet sich daher zur Behandlung von Depressionen verschiedener Genese und unterschiedlichen Schweregrades, insbesondere, wenn diese mit Erregung und Angst einhergehen. Darüberhinaus konnten Schlafstörungen aus psychischer Ursache erfolgreich mit Ax therapiert werden. Nebenwirkungen - wie bei allen tricyclischen Antidepressiva im wesentlichen auf eine anticholinerge Wirkkomponente zurückzuführen - treten nur selten auf und sind unbedenklich. Die Laborwerte, das EKG und das EEG zeigen unter der Behandlung keine pathologischen Veränderungen.

Übersicht über das Schicksal des Amitriptylin-N-Oxids im menschlichen Körper.

(Soweit keine Forschungsergebnisse über Amitriptylin-N-Oxid vorliegen, ist angegeben, welche Resultate für das chemisch sehr nahe verwandte Imipramin-N-oxid beschrieben wurden.)

Amitriptylin-N-Oxid wird nach oraler Gabe schnell und nahezu vollständig aus dem Magen-Darm-Trakt resorbiert (17). Es erscheint schnell im Plasma und erreicht nach 1 - 2 Stunden einen Höchstwert (17). Die gegenüber dem tertiären Amin (Amitriptylin) schnellere Aufnahme des N-Oxides (8) läßt darauf schließen, daß hier die Resorption - bedingt durch den deutlich niedrigeren pK-Wert und die (im Neutralen) größere Polarität (2, 3, 6) - bereits im sauren Milieu des Magens erfolgt (20). Der Plasmaspiegel des unveränderten Pharmakons

sinkt dann mit einer Halbwertszeit von etwa 2 Stunden (8, 13, 17) wieder ab.

(Intravenöse oder intramuskuläre Applikation des Pharmakons ist ebenfalls möglich ; bei i.m.-Injektion von Imipramin-N-Oxid werden jedoch etwas geringere Plasmaspiegel erreicht als nach oraler Gabe (20).)

Die Blut-Hirn-Schranke ist für das N-Oxid (aufgrund seiner hohen Polarität) nach Ansicht einiger Autoren nicht durchgängig (3, 5). NAGY dagegen fand nach i.m.-Injektion von Imipramin-N-Oxid in Ratten, daß das Pharmakon im Gehirn ebenso schnell auftrat wie im Plasma (19). Das gleiche konnten in neuerer Zeit MELZACKA und DANEK (16) bei peroraler Amitriptylin-N-Oxid-Gabe an Ratten feststellen.

Nach MAJ et al. (15) wirkt Amitriptylin-N-Oxid im ZNS prinzipiell gleichartig wie Amitriptylin, nur schwächer.

Die antidepressive Wirkung des Ax wird also möglicherweise ganz, oder zum Teil über das tertiäre Amin vermittelt -

bzw. über das Verhältnis von Amitriptylin : Nortriptylin (10) (At wirkt serotonerg; Nt noradrenerg (9)).

Daher stellt sich die Frage, wo und in welchem Ausmaß die Reduktion des Amitriptylin-N-Oxids zum tertiären Amin Amitriptylin erfolgt.

In vielen Geweben sowie im Blut (weniger in der Leber) wurde eine solche N-Oxid-Reduktion gefunden (3, 7, 18) (Strukturformel siehe Abb. 1).

Nach MINDER wird Imipramin-N-Oxid in Ratten zu etwa 90 % extrahepatisch metabolisiert (18), im Gegensatz zum tertiären Amin, dessen Abbau fast ausschließlich in der Leber geschieht. NAGY fand, daß nach Ix-Applikation in Ratten Imipramin in den roten Blutzellen und im Gehirn (!) der Hauptmetabolit war (19).

A M I T R I P T Y L I N - N - O X I D

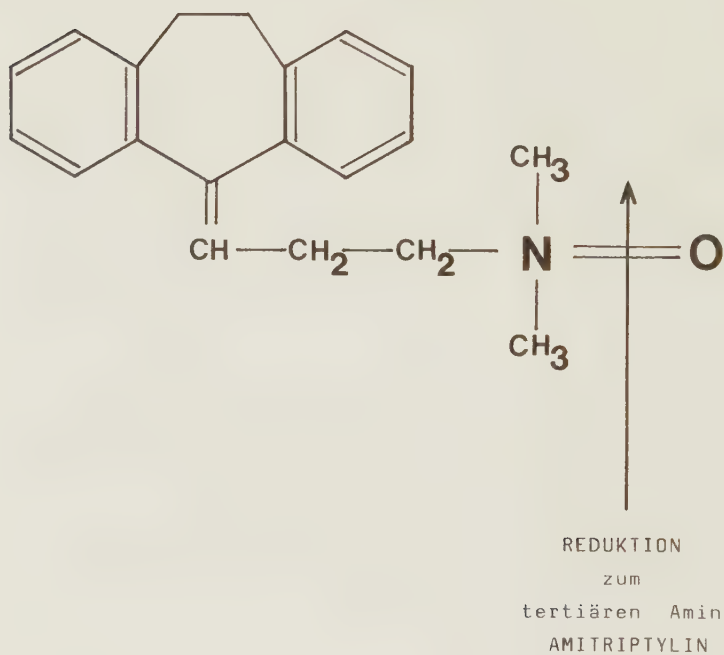


Abb. 1

Strukturformel von Amitriptylin-N-Oxid
und Angriffspunkt der Reduktion des N-Oxids zum tertiären Amin
Amitriptylin.

Bei in-vitro-Inkubation von Blut mit Imipramin-N-Oxid läuft die Reduktion ohne Kofaktoren ab (3). BICKEL fand, daß diese Reaktion von Hämoglobin (bzw. vom Häm) katalysiert wird, sehr schnell (unter 1 Minute) abläuft, wenig hitze-labil ist und durch molekularen Sauerstoff unterdrückt wird (3, 7). Auch mit Fe^{++} -Ionen konnte ein vergleichbarer Umsatz erreicht werden (3, 21).

Wird das Blut von Patienten, die Amitriptylin-N-Oxid erhielten in Erythrocyten und Plasma aufgetrennt und die beiden Fraktionen getrennt untersucht, zeigt sich, daß in den Erythrocyten das Amitriptylin überwiegt, also ein Großteil des N-Oxids reduziert wurde, während im Plasma fast ausschließlich das unveränderte Pharmakon vorliegt (13). Bei Imipramin-N-Oxid-Applikation ergaben sich entsprechende Resultate (20).

Über die pharmakokinetische Bedeutung dieses Umsatzes, der intrazellulär oder bei der Membranpassage (19) stattfinden muß, herrscht Unklarheit.

Die Interpretation von in-vivo-Messungen wird zudem dadurch erschwert, daß tertiäre Amine in der Leber wieder zum N-Oxid oxidiert werden können (1, 2, 3, 4, 7). Es wird also von einem reversiblen Gleichgewicht zwischen tertiärem Amin und N-Oxid ausgegangen (3, 4, 19).

Diese Wechselbeziehungen sind in Anlehnung an BICKEL (3, 4) in Abbildung 2 dargestellt.

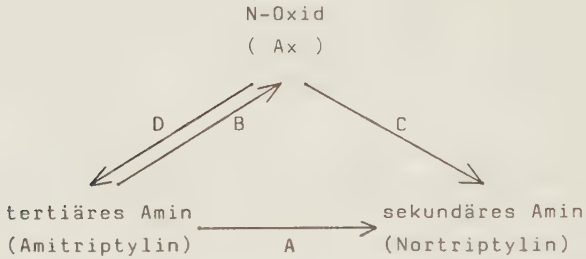


Abb. 2

Metabolismus von N-Oxiden und tertiären Aminen im menschlichen Körper. (nach BICKEL 3, 4)

Erforderlich sind für die

- Reaktionen A und B : Lebermikrosomen + NADPH
- Reaktionen C und D : Leberhomogenat ohne Kofaktoren

Die Reaktionen A und B in Abbildung 2 erfordern Lebermikrosomen plus NADPH, die Reaktionen C und D dagegen Leberhomogenat ohne Kofaktoren. Das heißt, die ersten Abbaureaktionen des tertiären Amins sind mikrosomal (im endoplasmatischen Retikulum der Hepatocyten) lokalisiert, diejenigen des N-Oxids, mit denen sich die vorliegende Arbeit beschäftigt, aber extramikrosomal.

Die von BICKEL beschriebenen Eigenschaften der Reaktionen C und D entsprechen weitgehend denen der N-Oxid-Reduktion im Blut (s. o.). Diese Reaktionen könnten also durch Blut-Reste im Leberhomogenat verursacht werden.

Entgegen einer ganzen Reihe von Untersuchungen, die eine N-Oxid-Reduktion in verschiedenen extrahepatischen Geweben, vor allem in den Erythrocyten nahelegen (3, 7, 18, 19, 20), schlugen POWIS und DeGRAW (19), die mit einem anderen therapeutisch eingesetzten N-Oxid (Indizin-N-Oxid) experimentierten vor, daß die Katalyse der N-Oxid-Reduktion durch Hämoglobin erst dann auftritt, wenn das Hämoglobin durch ein organisches Lösungsmittel denaturiert wird.

(Organische Lösungsmittel werden üblicherweise zur Extraktion der nachzuweisenden Substanzen aus den Inkubationsansätzen verwendet.)

Natives Hämoglobin verursacht nach diesen Autoren keinerlei Reaktion. Träfe diese Annahme zu, so wäre die Bildung von tertiären Aminen aus N-Oxiden in Hämoglobin enthaltenden Inkubationsansätzen nach Kontakt mit organischen Lösungsmitteln als bloßer Laborartefakt zu betrachten.

Zahlreiche Versuche zum Metabolismus von N-Oxiden bedürften damit einer gründlichen Neuinterpretation.

PROBLEMSTELLUNG UND ZIEL DER ARBEIT

Die Reduktionsreaktion von N-Oxid-haltigen tricyclischen Antidepressiva im Organismus ist bis heute nicht eindeutig geklärt.

Wie in der Einleitung beschrieben, vertritt BICKEL (3) aufgrund seiner Untersuchungen die Meinung, daß diese Reduktion durch natives Hämoglobin (in zirkulierenden Erythrocyten) katalysiert wird, während POWIS und DeGRAW (19) Hinweise dafür fanden, daß die N-Oxid-Reduktion durch Hämoglobin erst nach Denaturierung mit organischen Lösungsmitteln stattfindet, also ein Laborartefakt ist.

In der vorliegenden Arbeit sollte dieses Problem in in-vitro-Studien einer Lösung näher gebracht werden :

Um die Eigenschaften der N-Oxid-Reduktion zu klären, wurde plasmafreies Erythrocyten-Hämolysat mit Ax inkubiert. Durch Inkubationen mit Vollblut sollten die Austauschprozesse zwischen Plasma und Erythrocyten eingehend untersucht und durch Inkubationen von vorinkubierten (pharmakonhaltigen) Erythrocyten in frischen Plasma genauer beschrieben werden. Daneben sollten die Bedingungen der Pharmakaextraktion zur quantitativen Bestimmung mittels Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie geprüft und gegebenenfalls verbessert werden.

M A T E R I A L I E N U N D M E T H O D E N

In diesem Abschnitt sind die Materialien und Verfahrensweisen beschrieben, die bei allen Experimenten angewandt wurden. Abweichungen und Ergänzungen sind den einzelnen Versuchsbeschreibungen vorangestellt.

Die Entnahme des Blutes aus der Vene erfolgte jeweils kurz vor den Versuchen, bei gesunden, meist männlichen Personen. Das Blut wurde mit Heparin antikoaguliert und die Erythrocyten vom Plasma durch Zentrifugation (15 Minuten bei 5°C) abgetrennt.

Für die Versuche mit Vollblut (Erythrocyten in Plasma) wurden gleiche Volumina Erythrocyten und Plasma wieder miteinander vermischt. Die entstehende Suspension entspricht normalem Vollblut mit einem Hämatokrit-Wert von 50 %. Dieses in der einschlägigen Literatur bisher nicht beschriebene Verfahren hat den Vorteil, daß die Pharmakonverteilung zwischen Plasma und roten Blutzellen nicht durch die individuell unterschiedlichen Hämatokrit-Werte verschiedener Probanden beeinflußt wird.

Falls nicht anders angegeben, ist in dieser Arbeit mit "Vollblut" immer diese Erythrocyten-Plasma-Suspension gemeint.

(Bei einigen Versuchen wurden andere Mischungsverhältnisse gewählt, oder anstelle von Plasma PBS-Puffer* - plasmaisoton, pH 7,4 - verwendet.)

* PBS : phosphat buffer solution :

NaCl-Lösung 0,8 % + Phosphatpuffer 0,06 m
auf pH 7,4

Für die Experimente mit plasmafreiem Erythrocyten-Hämolysat wurden die Erythrocyten einmal mit PBS-Puffer gewaschen (suspendiert und erneut abzentrifugiert) und anschließend durch mehrmaliges Einfrieren in mit Trockeneis gekühltem Äthanol hämolysiert.

Das pulverförmige Dihydrat des Amitriptylin-N-Oxids kam von der Firma Nattermann GmbH, das Hydrochlorid des Amitriptylins von Lundbeck, die Hydrochloride von Imipramin und Chlorimipramin sowie die Dihydrate ihrer N-Oxide von Ciba-Geigy.

Von den Pharmaka wurde jeweils eine Stammlösung hergestellt, die 1 mg des Medikaments in 1 ml $H_2O_{\text{bidest.}}$ enthielt. Da die Substanzen in Wasser schwer löslich sind, war dafür die Zugabe von 10 μl 1,0 N HCl notwendig.

Durch geeignete Verdünnung einer solchen Stammlösung mit PBS-Puffer vor den einzelnen Versuchen, entstanden Lösungen, deren Konzentrationen es erlaubten, die jeweils gewünschte Pharmakonmenge in einem Volumen von 10 μl - 20 μl dem Inkubationsansatz zuzugeben. (Dieses Volumen ist mengenmäßig vernachlässigbar, aber exakt zu pipettieren.)

Vor der Beimengung der Pharmakon-Lösung wurde das Hämolysat bzw. die Erythrocyten-Suspension im Wasserbad auf 37°C erwärmt und dann bis zum Ende der vorgesehenen Inkubationszeit unter leichtem Schütteln auf dieser Temperatur gehalten.

Bei den Erythrocyten-Suspensionen mußten anschließend zunächst die Blutzellen vom umgebenden Medium abzentrifugiert und in der oben beschriebenen Weise hämolysiert werden.

(Ein Waschen der Erythrocyten vor der Hämolyse entfiel in diesem Fall, um

1. keine Substanzen zu verlieren, die bei einem solchen Waschvorgang aus den Erythrocyten in den Puffer diffundiert wären, und
2. die Zeitspanne zwischen dem Ende der Inkubationszeit und dem Beginn der Extraktion möglichst kurz zu halten.)

Die Extraktion der Pharmaka und ihrer Metaboliten aus dem Hämolysat bzw. dem Plasma erfolgte durch Zugabe von 4,0 ml Dichlormethan und 15-minütiges Ausschütteln.

(Zuvor waren Extraktionsversuche durchgeführt worden mit : Hexan , Hexan + 15 %-Isoamylalkohol , Cyclohexan , Diäthyl-Äther , Choloroform und Dichlormethan.

Die Extraktionen mit Dichlormethan lieferten bezüglich Extraktionsausbeute und Sauberkeit des Chromatogramms die besten Ergebnisse.)

Bei wenigen Versuchen wurden die Ansätze vor Zugabe des Dichlormethans mit NaHCO_3 -Puffer (pH 10,5) oder mit 0,1 N NaOH alkalisiert. Es zeigte sich jedoch, daß ein solches Vorgehen keinen positiven Einfluß auf die Extraktionsausbeute hat, und es entfiel daher bei den weiteren Versuchen. (Vergleiche dazu V. B.), S. 25 ff .)

Nach dem Ausschütteln wurde die Dichlormethanphase vom Überstand getrennt, das Lösungsmittel im Evaporator abgedampft und die am Boden des Reagenzröhrchens verbliebenen, nachzuweisenden Substanzen (entweder bis zu Analyse eingefroren oder sofort) in einer geringen Menge (50 μl - 100 μl) Eluens gelöst und in einen Hochdruckflüssigkeitschromatographen (HPLC) eingespritzt.

Eluens :

32 % Acetonitril + 68 % Phosphatpuffer (pH 2,8 / 0,05 M)

Hochdruckflüssigkeitschromatograph :

HPLC-Pumpe Waters 6000 A +
hewlett-packard-Injektionssystem

Säule :

Nucleosil C 18 5 μ 25 cm von Macherey & Nagel

Die Messung der Absorption erfolgte bei einer Wellenlänge von 254 nm (UV-Bereich) (vgl. 14).

Die Chromatogramme wurden zum Teil von Hand, zum Teil von einem angeschlossenen Integrator vermessen und durch Vergleich mit Standardlösungen definierter Konzentrationen in Nanogramm umgerechnet.

Es wurde nicht mit den Extraktionsverlusten korrigiert, da in erster Linie die prozentualen Umsätze interessieren und Amitriptylin und Amitriptylin-N-Oxid gleich gut extrahiert werden (vgl. V. B.)).

Für alle prozentualen Umsatzangaben, die in den folgenden Kapiteln dieser Arbeit gemacht werden gilt :

Die bei der Analyse wiedergefundene Gesamtmenge der Pharmaka ($A_x + A_t$ evtl. + N_t) ist gleich 100 % gesetzt. Davon ist dann der jeweilige Anteil der einzelnen Substanz ($A_x / A_t / N_t$) berechnet und angegeben.

(Die meist sehr geringen Nortriptylin-Mengen - bis 1 % - sind nur berücksichtigt, wenn eine Interpretation möglich ist.)

=====

E R G E B N I S S E

=====

VERSUCHE ZUR METHODIK =====

A.) Antikoagulation mit Heparin oder EDTA.

Um Versuche mit Erythrocyten durchführen zu können ist es nötig, das Blut sofort nach der Entnahme aus der Vene ungerinnbar zu machen.

Zur Prüfung, ob die Art der verwendeten Antikoagulation einen Einfluß auf die N-Oxid-Reduktion hat, wurden gleiche Volumina Blut (von derselben Versuchsperson) zum einen Teil mit Heparin und zum anderen Teil mit EDTA ungerinnbar gemacht. Dann wurde die Reduktion von Amitriptylin-N-Oxid, Imipramin-N-Oxid und Chlorimipramin-N-Oxid durch die beiden Hämolysate untersucht.

VERSUCHSDURCHFÜHRUNG:

Inkubation von jeweils 0,5 ml Hämolysat (aus Heparin-antikoaguliertem Blut, bzw. aus EDTA-antikoaguliertem Blut) mit jeweils 2.000 ng N-Oxid (Ax oder Ix oder Cx) bei 37°C.

Inkubationszeiten: 10 und 90 Minuten.

Je ein Versuch.

ERGEBNISSE:

Ergebnisse in Nanogramm, s. Anhang Tabellen 28 - 30.

Ergebnisse in Prozenten, s. Tabelle 1

Tabelle 1

Frozentualer Anteil des tertiären Amins (At, Im, Cl) nach Inkubation des N-Oxides (Ax, Ix, Cx) mit Hämolysat.

	Hämolysat aus E D T A - antikoaguliertem Vollblut	Hämolysat aus H e p a r i n - antikoaguliertem Vollblut
AX → AT	24 % At	23 % At
IX → IM	14 % Im	12 % Im
CX → CL	18 % Cl	19 % Cl

Verglichen werden Inkubationen mit Hämolysat, das aus EDTA-antikoaguliertem Vollblut hergestellt wurde und Inkubationen mit Hämolysat, das aus Heparin-antikoaguliertem Vollblut hergestellt wurde.

Verwendet wurden je 0,5 ml Hämolysat und 2.000 ng N-Oxid. Die Werte für die beiden Inkubationszeiten (10 und 90 Minuten) konnten gemittelt werden, da sich kaum Unterschiede ergaben.

Es zeigt sich, daß zwar die drei N-Oxide in unterschiedlich starkem Maß reduziert werden, daß aber die Art der Antikoagulation für den Umsatz keine Rolle spielt (Tab. 1) .

ZUSAMMENFASSUNG:

Das Ausmaß der N-Oxid-Reduktion in Hämolysat wird durch die Art der Antikoagulation nicht beeinflusst.

B.) Die Bedeutung der Alkalisierung des Inkubationsansatzes für die Extraktionsausbeute.

Es bestand die Vermutung, daß die nachzuweisenden N-Oxide und tertiären Amine im alkalischen Milieu besser in die organische (hydrophobe) Dichlormethan-Phase extrahiert werden, als bei neutralem oder gar saurem pH. Deswegen erfolgte bei den ersten Versuchen vor der Extraktion der Proben eine Alkalisierung mit NaHCO_3 -Puffer (pH 10,5) oder mit 0,1 N NaOH (1 ml Lauge/ml Hämolytat, pH 10,3).

Zur Überprüfung dieser Annahme wurden :

- a) Übliche Inkubationsansätze z.T. ohne und z.T. nach unterschiedlich starker Alkalisierung extrahiert, und
- b) Inkubationen bei verschiedenen pH-Werten vorgenommen (d.h., dem Hämolytat vor der Zugabe des Ax etwas Lauge oder Säure beigemischt) und diese pH-Werte zur Extraktion z.T. unverändert belassen und z.T. durch NaOH-Zugabe zur alkalischen Seite verschoben. (s. Schema 1).

VERSUCHSDURCHFÜHRUNG:

Inkubationen von je 1 ml Hämolytat 60 Minuten bei 37°C mit 2.000 ng, bzw. 5.000 ng, bzw. 20.000 ng Ax

Der genaue Versuchsablauf ist im folgenden Schema 1 dargestellt.

SCHEMA zur Versuchsdurchführung

Ax-Menge in ng	5000	2000	2000	20000	2000	2000	2000	2000
INKUBATION:	ohne Zusatz beim natürlichen pH-Wert des Hämolysates pH 7,5			+ 100 µl 0,1 N HCl pH 7,4		+ 100 µl 0,1 N NaOH pH 7,7		+
								1 ml 0,1 N NaOH pH 10,3
EXTRAKTION:		+	+		+		+	
	---	100 µl 0,1 N NaOH	1 ml 0,1 N NaOH	---	1.100 µl 0,1 N NaOH	---	900 µl 0,1 N NaOH	---
	pH 7,5	pH 7,7	pH 10,3	pH 7,4	pH 10,3	pH 7,7	pH 10,3	pH 10,3

Schema 1

ERGEBNISSE:

Ergebnisse in Nanogramm, s. Anhang Tabelle 31.

Ergebnisse in Prozenten, S. Tabelle 2.

Tabelle 2

Extraktionsausbeute und messbarer prozentualer Anteil von Amitriptylin nach Inkubationen von HämolySAT mit Ax bei verschiedenen pH-Werten des Ansatzes während der Inkubation bzw. während der Extraktion.

Ax-Menge in ng	5000	2000	2000	20000	2000	2000	2000	2000
INKUBATION:	pH-Wert des HämolySates pH 7,5			+ 100 µl 0,1 N HCl pH 7,4		+ 100 µl 0,1 N NaOH pH 7,7		+ 1 ml NaOH pH10,3
EXTRAKTION:	---	+ 100µl NaOH	+ 1 ml NaOH	---	+ 1,1ml NaOH	---	+ 900µl NaOH	---
	pH7,5	pH7,7	pH10,3	pH7,4	pH10,3	pH7,7	pH10,3	pH10,3
Extraktions- AUSBEUTE gemessenes Ax + At in Prozent vom eingesetzten Ax	40	42	18*	39	19*	45	14*	12*
UMSATZ (At-Anteil)	88	95	95	88	94	96	92	89

Verwendet wurde je 1 ml HämolySAT, Inkubationszeit 60 Minuten. Der pH-Wert der Ansätze wurde z.T. vor der Inkubation bzw. vor der Extraktion durch Zugabe von Natronlauge oder Salzsäure verändert (wie angegeben).

(Ein * kennzeichnet besonders niedrige Ausbeuten, die immer dann auftreten, wenn dem Inkubationsansatz bis zur Extraktion insgesamt 1ml 0,1 N NaOH zugegeben worden war.)

Eine Alkalisierung des Ansatzes vor der Extraktion wirkt sich keineswegs positiv auf die Extraktionsausbeute aus.

Das genaue Gegenteil ist der Fall:

Während die Ausbeute nach Extraktion beim pH-Wert des Hämolysates (pH 7,5), bei Zugabe von 100 μ l 0,1 N HCl (pH 7,4) oder 100 μ l 0,1 N NaOH (pH 7,7) jeweils ca. 40 % beträgt, geht dieser Anteil bei Zugabe von 1 ml 0,1 N NaOH pro ml Hämolysat (pH 10,3) auf unter 20 % zurück (s. Tab. 2; in der Tabelle sind die Ansätze mit diesen niedrigen Extraktionsausbeuten mit einem * gekennzeichnet).

Der gemessene Umsatz (Anteil des Amitriptylins) ist bei allen Proben recht ähnlich : ca. 90 % .

Daraus kann man schließen, daß pH-bedingte Veränderungen der Ausbeute zu keiner Verfälschung prozentualer Umsatz-Messungen führen, da die Ausbeuten des tertiären Amins (At) und die des N-Oxids (Ax) von pH-Verschiebungen gleich stark betroffen werden.

Die Frage der relativen Extraktionsausbeuten von At und Ax ist jedoch so wichtig, daß diesem Problem noch ein weiteres Experiment gewidmet wurde (s. die folgenden Seiten) denn zur quantitativen Betrachtung von Umsatzwerten ist es Voraussetzung zu wissen, ob N-Oxide und tertiäre Amine (und evtl. die sekundären Amine, Nt) gleich gut aus dem Inkubationsansatz extrahiert werden, oder wie groß der Unterschied ist.

Zur Klärung der Frage nach den relativen Extraktionsausbeuten von N-Oxiden, tertiären Aminen und Demethylierungsprodukten wurden Standardlösungen (s. u.) - wie sie auch bei der Analyse im HPLC zur Quantifizierung der Chromatogramme Verwendung fanden - menschlichem Blutplasma zugegeben und (z.T. mit, z.T. ohne Alkalisierung) extrahiert.

Standardlösungen enthalten gleiche, bekannte Mengen eines N-Oxides, des dazugehörigen tertiären Amins und Demethylierungsproduktes.

VERSUCHSDURCHFÜHRUNG:

Je 1 ml Plasma wurden 10 µl einer der folgenden Standardlösungen beigemengt. Die Pharmaka sind in Methanol gelöst.

Für die Extraktion ohne Alkalisierung:

Standard A ₁ :	je 5.000 ng	Ax , At , Nt	in 10 µl Lösung
Standard I ₁ :	je 5.000 ng	Ix , Im , DmI	in 10 µl Lösung
Standard C ₁ :	je 5.000 ng	Cx , Cl , DC	in 10 µl Lösung

Für die Extraktion mit Alkalisierung :

Standard A ₂ :	je 2.000 ng	Ax , At , Nt	in 10 µl Lösung
Standard I ₂ :	je 2.000 ng	Ix , Im , DmI	in 10 µl Lösung
Standard C ₂ :	je 2.000 ng	Cx , Cl , DC	in 10 µl Lösung

Diese Ansätze wurden vor der Extraktion mit 1 ml 0,1 N NaOH alkalisiert.

Eine Inkubation vor der Extraktion erfolgte nicht.

Mit Hämolystat konnte ein derartiger Versuch natürlich nicht durchgeführt werden, weil dort eine N-oxid-Reduktion stattgefunden hätte.

ERGEBNISSE:

Ergebnisse in Nanogramm, s. Anhang Tab. 32 und 33 .

Von jeder Standardlösung wurde das N-Oxid am besten extrahiert.

Als Maß für die geringgradig unterschiedlichen Extraktionsausbeuten wurde ein EXTRAKTIONSQUOTIENT (EQ) berechnet.

$$EQ = \frac{\text{ng (N-Oxid)}}{\text{ng (tertiäres bzw. sekundäres Amin)}}$$

Für das N-Oxid ist dieser Extraktionsquotient definitionsgemäß immer gleich 1,0 .

Es ergaben sich folgende EXTRAKTIONSQUOTIENTEN :

a) bei Extraktion ohne Alkalisierung :

<u>Amitriptylin</u> : 1,03	/	Nortriptylin	: 1,45
Imipramin : 1,05	/	Demethyl-Imipramin	: 1,66
Chlorimipramin: 1,15	/	Demethyl-Chlorimipramin:	1,33

b) bei Extraktion mit Alkalisierung :

<u>Amitriptylin</u> : 1,00	/	Nortriptylin	: 1,14
Imipramin : 1,18	/	Demethyl-Imipramin	: 1,31
Chlorimipramin: 1,15	/	Demethyl-Chlorimipramin:	1,26

Strenggenommen müßten bei allen Versuchen die Meßergebnisse mit diesen Extraktionsquotienten multipliziert werden, um die Absolutmengen zu erhalten.

Die Werte für die tertiären Amine (und ganz besonders für das Amitriptylin) sind jedoch so gering, daß man sie ohne Einbuße an Genauigkeit vernachlässigen kann.

Beachtenswerte Höhe erreichen die Extraktionsquotienten nur bei den Demethylierungsprodukten (sekundären Aminen) Nortriptylin, Desmethyl-Imipramin und Desmethyl-Chlorimipramin. Dort führt eine Alkalisierung des Inkubationsansatzes vor der Extraktion zu einer Verbesserung der Ausbeute. Da diese Demethylierungsprodukte jedoch nicht Thema dieser Arbeit sind, und aufgrund der sehr geringen Meßwerte ohnehin keine quantitativen Aussagen möglich sind, erübrigt sich auch hier eine Berücksichtigung der betreffenden Extraktionsquotienten.

Soweit die tertiären Amine betroffen sind, bleibt der (sehr geringe) EQ praktisch gleich, unabhängig davon, ob der Ansatz vor der Extraktion alkalisiert wurde oder nicht. Eine pH-Verschiebung vor der Extraktion führt also zu keiner Veränderung der relativen Extraktionsausbeuten von N-Oxiden und tertiären Aminen, und damit zu keiner Verfälschung der Meßergebnisse.

ZUSAMMENFASSUNG:

Amitriptylin-N-Oxid und Amitriptylin werden mit Dichlormethan gleich gut extrahiert.

Dies gilt unabhängig davon, ob der Ansatz vor der Extraktion alkalisiert wurde oder nicht.

Jedoch wird die Ausbeute (gleichermaßen für Ax und At) durch eine Alkalisierung vermindert.

VERSUCHE ZUR PROBLEMSTELLUNG
=====

I. EXPERIMENTE MIT HÄMOLYSAT

1.) Ort der N-Oxid-Reduktion.

Inkubationen von menschlichem Blut mit Amitriptylin-N-Oxid führen zur Bildung des tertiären Amins Amitriptylin (siehe alle Tabellen des Anhangs) sowie einer geringen Menge des Demethylierungsproduktes (sekundären Amins) Nortriptylin (s. Tabellen 49, 50, 80).

Um zu erfahren, welcher Bestandteil des Blutes für die N-Oxid-Reduktion verantwortlich ist, wurden Inkubationen von Ax mit verschiedenen Blutbestandteilen durchgeführt. Dabei wurde jeweils der Anteil, in dem ein Umsatz nachgewiesen werden konnte, im nächsten Schritt des Experimentes weiter aufgetrennt.

VERSUCHSDURCHFÜHRUNG:

Inkubation von je 2.000 ng Ax für 60 Minuten bei 37°C mit je einem der folgenden Blutbestandteile
(jeweils Doppelbestimmungen) :

Erythrocyten (und Erythrocyten-Hämolysat)

Blut Plasma

Erythrocyten-Membranen

Erythrocyten-Cytoplasma

Erythrocyten-Cytoplasma-Bestandteile mit MG < 10.000

Erythrocyten-Cytoplasma-Bestandteile mit MG > 10.000

Trennungsvorgänge:

Auftrennen von Vollblut in Erythrocyten und Plasma
durch Zentrifugation für 15 Minuten bei 5°C.

Auftrennen von Erythrocyten-Hämolysat in Membranen und
Cytoplasma
durch Zentrifugation bei 20.000 G für 15 Minuten bei 20°C.

Auftrennen von Erythrocyten-Cytoplasma in Bestandteile
mit einem Molekulargewicht < 10.000 bzw. > 10.000
durch Ultrafiltration.

ERGEBNISSE:

Qualitative Ergebnisse siehe Tabelle 3.

(Eine genaue Angabe der Nanogrammwerte erübrigt sich hier,
da es nur darauf ankommt, ob ein Umsatz stattfindet oder
nicht.)

Tabelle 3

Ort der N-Oxid-Reduktion

			Keine N-Oxid-Reduktion	Amitriptylin- Bildung
Trennungsverfahren	Zentrifugation		BLUT-PLASMA	VOLLBLUT
	Zentrifugation		ERYTHROCYTEN- MENBRANEN	ERYTHROCYTEN
	Ultrafiltration		ERYTHROCYTEN- CYTOPLASMA MG < 10.000	CYTOPLASMA MG > 10.000
				in H ₂ O bidest. gelöstes, reines Hämoglobin

Durch eine sukzessive Auftrennung des Blutes in seine Bestandteile, konnten als Ort der N-Oxid-Reduktion Bestandteile des Erythrocyten-Cytoplasmas mit einem Molekulargewicht von mehr als 10.000 identifiziert werden. Dabei handelt es sich mit größter Wahrscheinlichkeit um das Hämoglobin.

Die N-oxid-Reduktion ließ sich auf Bestandteile des Erythrocyten-Cytoplasmas mit einem Molekulargewicht von mehr als 10.000 zurückführen.

Dabei dürfte es sich sehr wahrscheinlich um den roten Blutfarbstoff, das H ä m o g l o b i n handeln (Häm-Katalyse, s. BICKEL, 3).

Diese Annahme wird dadurch gestützt, daß auch in $H_2O_{bidest.}$ gelöstes, reines, kristallines Human-Hämoglobin zu einer Reduktion des Amitriptylin-N-Oxids zum Amitriptylin führt:

VERSUCHSDURCHFÜHRUNG und ERGEBNISSE:

Inkubation von 2.000 ng Ax für 60 Minuten bei 37°C mit einer Lösung von 50 mg kristallinem Human-Hämoglobin in 1 ml $H_2O_{bidest.}$ (Das ist etwa ein Drittel der Hämoglobin-Konzentration im Blut. Eine größere Menge Hämoglobin konnte nicht zur Lösung gebracht werden.)

Doppelbestimmung.

Die Inkubation ergab einen Amitriptylin-Anteil von ca. 20 %.

ZUSAMMENFASSUNG:

Für die N-oxid-Reduktion in Blut sind Bestandteile des Erythrocyten-Cytoplasmas mit einem Molekulargewicht von mehr als 10.000 verantwortlich.

Auch reines Hämoglobin katalysiert diese Reaktion.

2.1 Die Reaktionsgeschwindigkeit

In drei voneinander unabhängigen Versuchen (mit dem Blut von drei verschiedenen Personen) sollte die Zeitabhängigkeit der N-Oxid-Reduktion festgestellt werden. Dabei betrug die kürzeste verwendete Inkubationszeit ca. zwei Minuten. Diese konnte aus technischen Gründen nicht weiter unterschritten werden. (Das Herausnehmen der Proben aus dem Wasserbad, die Zugabe des Dichlormethans und das Einsetzen der Reagenzröhrchen in den Schüttler benötigen etwa diese Zeit.) Es kamen verschiedene Mengen Hämolytat und verschiedene Ax-Mengen zum Einsatz.

VERSUCHSURCHFÜHRUNG:

Hämolytat A :

je 50 µl Hämolytat mit 200 ng Ax und mit 2.000 ng Ax

Hämolytat B :

je 250 µl Hämolytat mit 2.000 ng Ax und mit 20.000 ng Ax

Hämolytat C :

je 1 ml Hämolytat mit 200 ng Ax und mit 2.000 ng Ax

Inkubationszeiten jeweils 2 Minuten und 60 Minuten
bei 37 ° C

bei Hämolytat B Doppelbestimmungen.

ERGEBNISSE:

Ergebnisse in Nanogramm, s. Anhang, Tab. 36 .

Ergebnisse in Prozenten, s. Tabelle 4 .

Tabelle 4

Meßbarer prozentualer Anteil von Amitriptylin und Amitriptylin-N-Oxid nach Inkubationen unterschiedlicher Mengen verschiedener Hämolysate mit verschiedenen Ax-Mengen für die beiden Inkubationszeiten: 2 Minuten und 60 Minuten

Inkubations-zeit	Analyse	50 µl HämolySAT A					250 µl HämolySAT B					1.000 µl HämolySAT C					Gesamt- Mittelwert
		+ 200 ngAx		+ 2000 ngAx		Mittel- wert	+ 2.000 ng Ax		+ 20.000 ng Ax		Mittel- wert	+ 200 ngAx		+ 2000 ngAx		Mittel- wert	
2 min.	At	19	18	18	18	22	34	33	30	30	39	40	39	40	39	29	
	Ax	81	82	82	82	78	66	67	70	70	61	60	61	60	61	71	
60 min.	At	22	16	19	19	27	28	31	27	28	42	38	40	38	40	29	
	Ax	78	84	81	81	73	72	69	73	72	58	62	60	62	60	71	

Der nach zwei Minuten gemessene prozentuale Umsatz entspricht bereits dem, der auch nach einer Inkubationszeit von einer Stunde beobachtet wird. (s. Tab. 4)

Dies gilt für alle drei Hämolysate, unabhängig von der Hämolysat-Menge und unabhängig von der Ax-Menge.

Die Reduktion des Amitriptylin-N-Oxids zum Amitriptylin ist also eine sehr schnell ablaufende Reaktion; so schnell, daß ihr Zeitverlauf mit den in dieser Arbeit verwendeten Methoden nicht verfolgt werden kann.

Es ist allerdings zu bedenken, daß die N-Oxid-Reduktion auch während der Extraktion des Inkubationsansatzes mit Dichlormethan (Dauer ca. 15 Minuten) weitergehen könnte. Dann wäre die kürzeste erreichbare Inkubationszeit erheblich länger als die erwähnten zwei Minuten und würde etwa 20 Minuten betragen (Dauer der Inkubation + Dauer der Extraktion + Arbeitszeit).

ZUSAMMENFASSUNG:

Die Reduktion des Amitriptylin-N-Oxids erfolgt so schnell, daß der Zeitablauf der Reaktion mit den verwendeten Methoden nicht verfolgt werden konnte.

Aufgrund dieser Verhältnisse beschreiben alle folgenden Ausführungen den Einfluß der untersuchten Parameter auf den Endpunkt der Reaktion, nach Erreichen des Reaktionsgleichgewichtes.

Über den Einfluß auf die Reaktionsgeschwindigkeit kann generell nur festgestellt werden, daß die Reaktion nach der kürzestmöglichen Inkubationszeit bereits abgeschlossen ist.

3.) Interindividuelle Unterschiede.

Bei Inkubationen von in gleicher Weise hergestelltem, plasmafreiem Erythrocyten-Hämolysat aus dem Blut verschiedener Personen, mit Amitriptylin-N-Oxid, fielen erhebliche interindividuelle Unterschiede im prozentualen Umsatz (Amitriptylin-Anteil) auf.

Um diese interindividuelle Variabilität genauer betrachten zu können, wurden 14 Versuche zusammengestellt, die

- an verschiedenen Tagen und unter verschiedenen Fragestellungen
- aber unter vergleichbaren Bedingungen durchgeführt wurden.

VERSUCHSDURCHFÜHRUNG:

Da die Versuche an verschiedenen Tagen unter verschiedenen Fragestellungen durchgeführt wurden, sind die Versuchsbedingungen nicht identisch, aber vergleichbar :

Hämolysat-Mengen zwischen 150 μ l und 1.000 μ l

Ax-Mengen zwischen 200 ng und 20.000 ng

Inkubationszeiten zwischen 5 Minuten und 90 Minuten

Inkubationstemperatur : 37 ° C .

Anzahl der Bestimmungen pro Versuch : 1 bis 4

(Ax-Mengen unter 2.000 ng und über 5.000 ng kommen nur gemittelt mit einer Ax-Menge von 2.000 ng vor, Inkubationszeiten unter 60 Minuten nur gemittelt mit der Inkubationszeit von 60 und mehr Minuten.)

Die genauen Versuchsbedingungen für jeden Versuch können der Ergebnis-Tabelle (Tab. 5) entnommen werden.

ERGEBNISSE:

Ergebnisse in Nanogramm, s. die in der letzten Spalte von Tabelle 5 genannten Versuche.

Ergebnisse in Prozenten, s. Tab. 5.

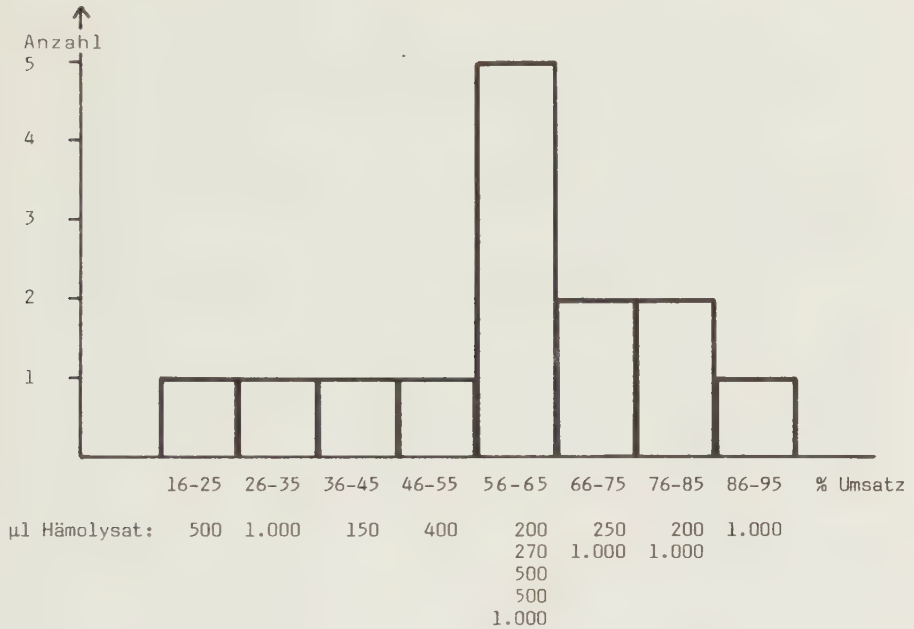


Abbildung 3

Die unterschiedlichen meßbaren Amitriptylin-Anteile und ihre relative Häufigkeit in 14 unabhängigen Versuchen nach Inkubationen von Ax mit Hämolysat aus dem Blut von 14 verschiedenen Personen.

Da unterschiedliche Hämolysat-Volumina verwendet wurden, was sich auf den Umsatz auswirken kann (s. V. 4.)) sind diese unter den Säulen angegeben: die Umsätze korrelieren nicht mit den Hämolysat-Volumina.

Tabelle 5

Meßbarer prozentualer Amitriptylin-Anteil nach Inkubationen von 14
Hämolyisaten aus dem Blut einer jeweils anderen Person mit verschiedenen
Mengen Ax.

Nr. des Versuches	Anzahl der Bestimmungen	Ax-Menge (in ng)	Inkubationszeit (in min.)	Menge Hämolyisat (in µl)	AMITRIPTYLIN-ANTEIL in Prozent	vgl. Versuch:
1	2	2.000	10 / 90	500	23	A.)
2	4	2000/20000	5 / 60	1.000	30	6.)
3	1	5.000	60	1.000	88	7.)
4	1	2.000	60	250	75	8.)
5	4	200/2.000	5 / 60	150	40	9.1.)
6	2	2.000	60	200	79	9.2.)
7	2	2.000	60	200	62	9.2.)
8	1	2.000	60	270	56	10.)
9	2	2.000	60	400	47	--
10	2	2.000	60	1.000	60	--
11	2	2.000	60	1.000	75	--
12	2	2.000	60	1.000	83	--
13	2	2.000	60	500	63	--
14	2	2.000	60	500	62	--
Mittelwert :					60	

Legende zu Tabelle 5

Die meisten Werte sind (wie angegeben) das Mittel aus zwei oder mehr Bestimmungen in einem Hämolysat, die trotz z.T. unterschiedlicher Ax-Mengen und Inkubationszeiten sehr ähnliche Resultate ergaben.

Die Hämolysat-Volumina und die anderen Versuchsbedingungen sind in der Tabelle angegeben, um zu zeigen, daß die inter-individuell stark unterschiedlichen Umsatzraten der verschiedenen Hämolysate nicht damit korrelieren.

Wo die angegebenen Meßwerte Versuchen entnommen sind, die an anderer Stelle in dieser Arbeit beschrieben werden, so ist deren Nummer in der letzten Spalte genannt.

Die Angaben der Tabelle sind in Abbildung 3 veranschaulicht.

In den 14 Versuchen wurden zwischen 23 % und 88 % des Amitriptylin-N-Oxids vom Hämolysat zu Amitriptylin reduziert. Am häufigsten wurde dabei ein Umsatz zwischen 56 % und 65 % beobachtet, der Durchschnitt lag bei 60 % . (s. Tab. 5 und Abb. 3)

Zwischen den Hämolysaten aus dem Blut verschiedener Personen ergeben sich also erhebliche interindividuelle Unterschiede, die nicht durch uneinheitliche Versuchsdurchführungen erklärbar sind (s. Tab. 5 und Abb. 3).

ZUSAMMENFASSUNG:

Durch Hämolysat verschiedener Personen wird Amitriptylin-N-Oxid in sehr unterschiedlich starkem Ausmaß reduziert. Es besteht eine große interindividuelle Variabilität.

Angesichts dieser erheblichen interindividuellen Variabilität der Reduktionsrate von Ax bei gleichen (oder sehr ähnlichen) Versuchsbedingungen, können Experimente, die den Einfluß verschiedener Parameter auf die Höhe des Umsatzes klären sollen, natürlich nur dann zu verwertbaren Ergebnissen führen, wenn für das ganze Experiment das gleiche Blut verwendet wird. Außerdem gelten die sich dann ergebenden q u a n t i t a t i v e n Aussagen nur für dieses spezielle Blut (bzw. Hämolysat).

Die q u a l i t a t i v e n Aussagen (Umsatzveränderungen) können wohl dennoch verallgemeinert werden:

z. B. führen gleiche Versuche mit verschiedenem Blut zu gleichen qualitativen Ergebnissen, auch wenn die absoluten gemessenen Pharmakon-Mengen unterschiedlich sind (s. z.B. V. 9.2.), V. 12.), Tabellen 15 und 18) .

4.) Der Einfluß der HämolySAT-Menge.

Um den eventuellen Einfluß der Menge des verwendeten HämolySates auf das Ausmaß der Reduktion von Amitriptylin-N-Oxid zum Amitriptylin zu untersuchen, wurden gleiche Mengen Ax unter identischen Versuchsbedingungen mit verschiedenen Volumina plasmafreien Erythrocyten-HämolySates inkubiert und anschließend analysiert.

VERSUCHSDURCHFÜHRUNG:

je 2.000 ng Ax wurden 60 Minuten bei 37°C mit
10 µl bzw. 30 µl bzw. 90 µl bzw. 270 µl HämolySAT inkubiert.

ERGEBNISSE:

Ergebnisse in Nanogramm, s. Anhang, Tab. 38.

Ergebnisse in Prozenten, s. Tab. 6.

Tabelle 6

Meßbarer prozentualer Anteil von Amitriptylin nach Inkubation von Amitriptylin-N-Oxid mit unterschiedlichen HämolySAT-Volumina.

2.000 ng Ax inkubiert mit: HämolySAT-Menge in µl	Amitriptylin-Anteil in Prozenten
10	6
30	10
90	21
270	56

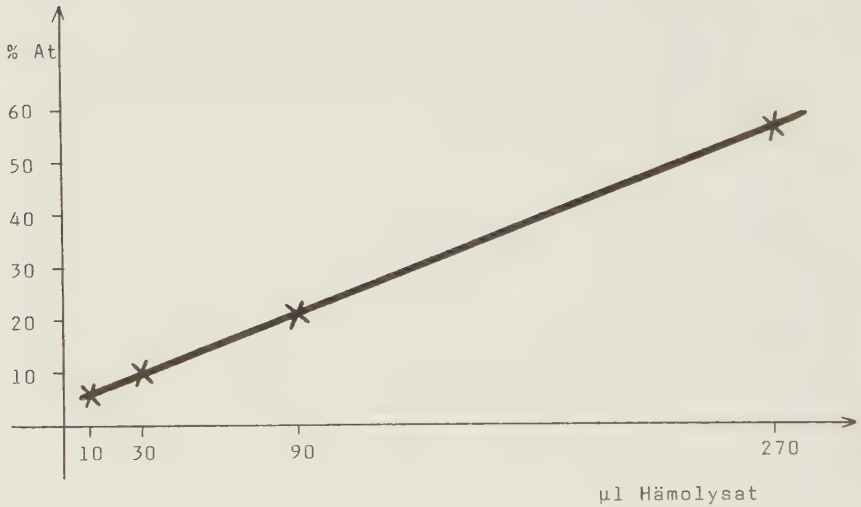


Abbildung 4

Graphische Darstellung des meßbaren prozentualen Anteils von Amitriptylin nach Inkubationen von 2.000 ng Ax mit verschiedenen Volumina plasmafreien Erythrocyten-Hämolysates

Bei Verwendung von Hämolysat aus dem Blut des gleichen Menschen, nimmt - zumindest in dem untersuchten Mengenbereich von 10 μ l bis 270 μ l - der prozentuale Umsatz (nicht die Umsatzgeschwindigkeit !!) mit steigenden Hämolysat-Volumina zu (s. Tab. 6 und Abb. 4).

Diese Umsatzsteigerung ist hier annähernd linear.

ZUSAMMENFASSUNG:

Größere Hämolysat-Volumina führen zu stärkeren prozentualen Umsätzen.

Im Bereich der in dieser Arbeit üblicherweise verwendeten Hämolysat-Volumina ist deren Einfluß auf die Reduktionsrate jedoch weit geringer als die interindividuelle Variabilität zwischen dem Blut verschiedener Personen (vgl. hierzu Versuch 3.) , Tab. 5 und Abb. 3).

Daher hat der Einsatz unterschiedlicher Hämolysat-Mengen in den verschiedenen Versuchen keinen negativen Einfluß auf die erreichbare Genauigkeit und Vergleichbarkeit der Ergebnisse.

5.) Der Einfluß der Amitriptylin-N-Oxid-Menge.

In drei Experimenten wurden unterschiedliche Amitriptylin-N-Oxid-Mengen - bei gleichen Hämolysat-Volumina und identischen sonstigen Versuchsbedingungen - verwendet.

Der dabei festgestellte Einfluß der Ax-Menge auf das Ausmaß der N-Oxid-Reduktion ist im folgenden zusammenfassend dargestellt.

VERSUCHSDURCHFÜHRUNG:

Versuch 1 : 400 µl Hämolysat inkubiert mit
200 ng Ax bzw. 2.000 ng Ax .

Versuch 2 : 400 µl Hämolysat inkubiert mit
200 ng Ax bzw. 20.000 ng Ax .

Versuch 3 : 150 µl Hämolysat inkubiert mit
200 ng Ax bzw. 2.000 ng Ax .

Die Ansätze wurden jeweils 60 Minuten lang bei 37 ° C inkubiert.

ERGEBNISSE:

Ergebnisse in Nanogramm, s. Anhang, Tabelle 40 .

Ergebnisse in Prozenten, s. Tabelle 7 .

Tabelle 7

Meßbarer prozentualer Anteil des zu Amitriptylin reduzierten Amitriptylin-N-Oxids in drei voneinander unabhängigen Versuchen nach Inkubation von Hämolysat mit verschiedenen Ax-Mengen.

Versuchs-Nr.	Hämolysat-Volumen	Amitriptylin-N-Oxid-Menge	Amitriptylin-Anteil nach Inkubation
1	400 µl	200 ng	53 %
		2.000 ng	45 %
2	400 µl	200 ng	49 %
		20.000 ng	43 %
3	150 µl	200 ng	40 %
		2.000 ng	39 %

Verglichen werden können immer nur die beiden Werte eines Versuchs.

Vergleiche zwischen den Versuchen wären nicht sinnvoll, da in den drei Versuchen Hämolysat aus dem Blut einer jeweils anderen Person verwendet wurde.

Obwohl die Ergebnisse der drei Versuche - auch aufgrund der interindividuellen Variabilität (s. V. 3.)) - nicht einheitlich sind, ist doch klar erkennbar, daß selbst eine wesentliche Steigerung der zu reduzierenden Ax-Menge zu einem nur geringfügigen Rückgang des prozentualen Umsatzes führt (s. Tab. 7).

Auch mit der größten verwendeten Amitriptylin-N-Oxid-Menge (20.000 ng, das entspricht in 400 µl Hämolysat einer Konzentration von 50 µg Ax/ml Hämolysat) wird die maximale Umsatzkapazität des Hämolysates noch nicht überschritten.

ZUSAMMENFASSUNG:

Auch bei sehr starker Steigerung der zu reduzierenden Amitriptylin-N-Oxid-Menge nimmt der prozentuale Umsatz kaum ab.

Es wurde keine maximale Umsatzkapazität erreicht.

Da die bei therapeutischer Anwendung von N-Oxiden auftretenden Konzentrationen wesentlich niedriger liegen (wenige µg/ml, 13) bedeutet dies, daß für die N-Oxid-Reduktion in vivo das Erreichen einer maximalen Umsatzkapazität (und daraus resultierender Einflüsse auf den Metabolismus des Medikamentes) nicht zu erwarten sind.

6.) Der Einfluß der Temperatur.

Um den Einfluß der Temperatur auf die N-Oxid-Reduktion zu untersuchen, und auch mit der Absicht, die Reaktion durch Inkubation bei einer niedrigen Temperatur so weit zu verlangsamen, der ihr Zeitablauf verfolgt werden kann, wurden drei verschiedene N-Oxide (darunter Amitriptylin-N-Oxid) außer bei der üblichen Inkubationstemperatur von 37°C auch bei 0°C inkubiert, und als Inkubationszeiten 5 Minuten und 60 Minuten gewählt. Darüberhinaus wurde der Versuch mit zwei verschiedenen Ax-Mengen durchgeführt.

VERSUCHSDURCHFÜHRUNG:

Je 2.000 ng und 20.000 ng eines der folgenden N-Oxide:

Amitriptylin-N-Oxid

Imipramin-N-Oxid

Chlorimipramin-N-Oxid

wurden zusammen mit 1 ml Erythrocyten-Hämolysat inkubiert.

Inkubationszeiten : 5 Minuten und 60 Minuten

Inkubationstemperaturen : 37 ° C und 0 ° C (Eisbad)

ERGEBNISSE:

Ergebnisse in Nanogramm, s. Anhang, Tabelle 42 .

Ergebnisse in Prozenten, s. Tabelle 8 .

Tabelle 8

Meßbarer prozentualer Anteil des zum tertiären Amin (At, Im, Cl) reduzierten N-Oxids nach Inkubation von Ax, Ix und Cx mit 1 ml Hämolytat bei den beiden Temperaturen 0°C und 37°C für 5 bzw. 60 Minuten.

	0 ° C		3 7 ° C	
	5 Minuten	60 Minuten	5 Minuten	60 Minuten
AX → AT	28	29	32	28
IX → IM	20	19	19	18
CX → CL	29	19	17	18

Alle Werte eines N-Oxides liegen in der gleichen Größenordnung.

Es zeigt sich keinerlei Abhängigkeit der Reduktionsrate von der Temperatur oder der Inkubationszeit.

Das heißt, auch bei einer Temperatur von 0 ° C ist die N-Oxid-Reduktion nach 5 Minuten abgeschlossen.

Die N-Oxid-Reduktion durch Hämolytat ist im untersuchten Bereich temperaturunabhängig. (s. Tab. 8)

(Diese Aussagen gelten auch für die Bildung der Demethylierungsprodukte - Nortriptylin, Desmethyl-Imipramin, Desmethyl-Chlorimipramin. Die Werte liegen bei allen Ansätzen für Nt und DmI zwischen 1 % und 2 %, für DC zwischen 0 % und 0,5 %.)

ZUSAMMENFASSUNG:

N-Oxid-Reduktion und Demethylierungsreaktion in Hämolytat verlaufen im Bereich von 0 ° C bis 37 ° C temperaturunabhängig.

7.) Der Einfluß des pH-Wertes.

Nach Feststellung der Temperatur-Unabhängigkeit der Ax-Reduktion interessierte die Frage nach einer eventuellen pH-Abhängigkeit.

Dazu wurde Ax mit nativem, angesäuertem und alkalisiertem Erythrocyten-Hämolysat inkubiert. (Ein Teil der Ansätze wurde zur Extraktion alkalisiert.)

(Im Abschnitt "Versuche zur Methodik" wurde dieses Experiment unter einem anderen Aspekt bereits behandelt; s. S. 32 ff.)

VERSUCHSDURCHFÜHRUNG:

je 1 ml Hämolysat 60 Minuten bei 37°C inkubiert.

Der genaue Versuchsablauf ist in folgendem Schema dargestellt.

Zusatz bei INKUBATION:	Kein Zusatz Inkubation beim natürlichen pH des Hämolysates			+ 100 µl 0,1 N HCl		+ 100 µl 0,1 N NaOH		+ 1ml NaOH
pH-Wert bei Inkubation:	7,5			7,4		7,7		10,3
Ax-Menge in ng :	5000	2000	2000	20000	2000	2000	2000	2000
Zusatz bei EXTRAKTION:	—	+ 100 µl NaOH	+ 1.000 µl NaOH	—	+ 1.100 µl NaOH	—	+ 900 µl NaOH	—
pH-Wert bei Extraktion:	7,5	7,7	10,3	7,4	10,3	7,7	10,3	10,3

Schema 2

(Die unterschiedlichen Ax-Mengen wurden verwendet, weil bei den neutralen und sauren Ansätzen eine geringere Extraktionsausbeute erwartet wurde als bei den alkalischen. Diese Annahme bestätigte sich jedoch nicht; vgl. S. 32 ff.)

ERGEBNISSE:

Ergebnisse in Nanogramm, s. Anhang Tab. 44.

Ergebnisse in Prozenten, s. Tabelle 9.

Tabelle 9

Meßbarer prozentualer Anteil des zu At reduzierten Ax nach Inkubationen von Hämolysat mit Ax, deren pH-Wert z.T. vor der Inkubation bzw. vor der Extraktion durch Zugabe von 0,1 N NaOH bzw. 0,1 N HCl bis zu den angegebenen pH-Werten verändert wurde.

Ax-Menge in ng	5000	2000	2000	20000	2000	2000	2000	2000
pH-Wert bei INKUBATION:	7,5			7,4		7,7		10,3
pH-Wert bei EXTRAKTION:	7,5	7,7	10,3	7,4	10,3	7,7	10,3	10,3
At in % :	88	95	95	88	94	96	92	89

Eine Alkalisierung oder Ansäuerung des Inkubationsansatzes hat im untersuchten Bereich - von pH 7,4 bis pH 10,3 - keinen Einfluß auf das Ausmaß der N-Oxid-Reduktion: Alle in Tabelle 9 angegebenen Meßergebnisse liegen in der gleichen Größenordnung. (Zum Einfluß stärkerer pH-Veränderungen, vgl. V. 9.2.), S. 72 ff.)

ZUSAMMENFASSUNG:

Die Reduktion von Ax zu At verläuft im Bereich von pH 7,4 bis pH 10,3 pH-unabhängig.

8.) Der Einfluß chemisch verwandter Pharmaka.

Hier wurde versucht, die Reduktion von Ax bzw. Ix bzw. Cx durch Zugabe der jeweils anderen N-Oxide, deren tertiärer und sekundärer Amine zu beeinflussen.

Die chemisch verwandten Pharmaka wurden dem Inkubationsansatz vor Inkubationsbeginn bzw. (zur Kontrolle) nach Inkubationsende beigemischt.

VERSUCHSDURCHFÜHRUNG:

je 250 µl Hämolysat mit 2.000 ng N-Oxid 60 Minuten
bei 37°C inkubiert.

Da die Peaks der zugegebenen und entstehenden Pharmaka im Chromatogramm z. T. zu nahe beieinander liegen um differenziert werden zu können, waren nicht alle denkbaren Pharmakakonzentrationen durchführbar.

Folgende Pharmaka-Kombinationen wurden inkubiert:

Den Ansätzen mit 2.000 ng Ax und

den Ansätzen mit 2.000 ng Ix wurden zugegeben :

je 2.000 ng bzw. 20.000 ng	DC bzw. C1
je 20.000 ng	DC + C1
2.000 ng	Cx

Den Ansätzen mit 2.000 ng Cx wurden zugegeben :

je 2.000 ng bzw. 20.000 ng	Nt bzw. At bzw. DmI bzw. Im
je 20.000 ng	Nt + At bzw. DmI + Im
2.000 ng	Ax bzw. Ix

Daneben wurde mit jedem N-oxid eine Kontrollinkubation ohne Zugabe chemisch verwandter Pharmaka durchgeführt.

ERGEBNISSE:

Ergebnisse in Nanogramm, s. Anhang, Tab. 45.

Ergebnisse in Prozenten, s. Tab. 10.

Tabelle 10

Prozentualer Anteil des zum tertiären Amin (At, Im, Cl) reduzierten N-Oxids, nach Inkubation von HämolySAT mit Ax, Ix und Cx unter Zugabe der angegebenen chemisch nahe verwandten Pharmaka.

		zugegebene verwandte Pharmaka						
	ohne Zusatz	D C		C l		DC+Cl	C x	Cl N
		2Tng	20Tng	2Tng	20Tng	20Tng	2Tng	20Tng
AX → AT	75	63	68	72	63	66	60	70
IX → IM	60	52	49	49	57	49	50	46

		zugegebene verwandte Pharmaka						
	ohne Zusatz	N t		A t		Nt+At	A x	At N
		2Tng	20Tng	2Tng	20Tng	20Tng	2Tng	20Tng
CX → CL	71	62	61	51	54	65	55	55

		zugegebene verwandte Pharmaka						
	ohne Zusatz	D m I		I m		DmI + Im	I x	Im N
		2Tng	20Tng	2Tng	20Tng	20Tng	2Tng	20Tng
CX → CL	71	68	72	66	59	69	55	61

2Tng = 2.000 ng ; 20Tng = 20.000 ng

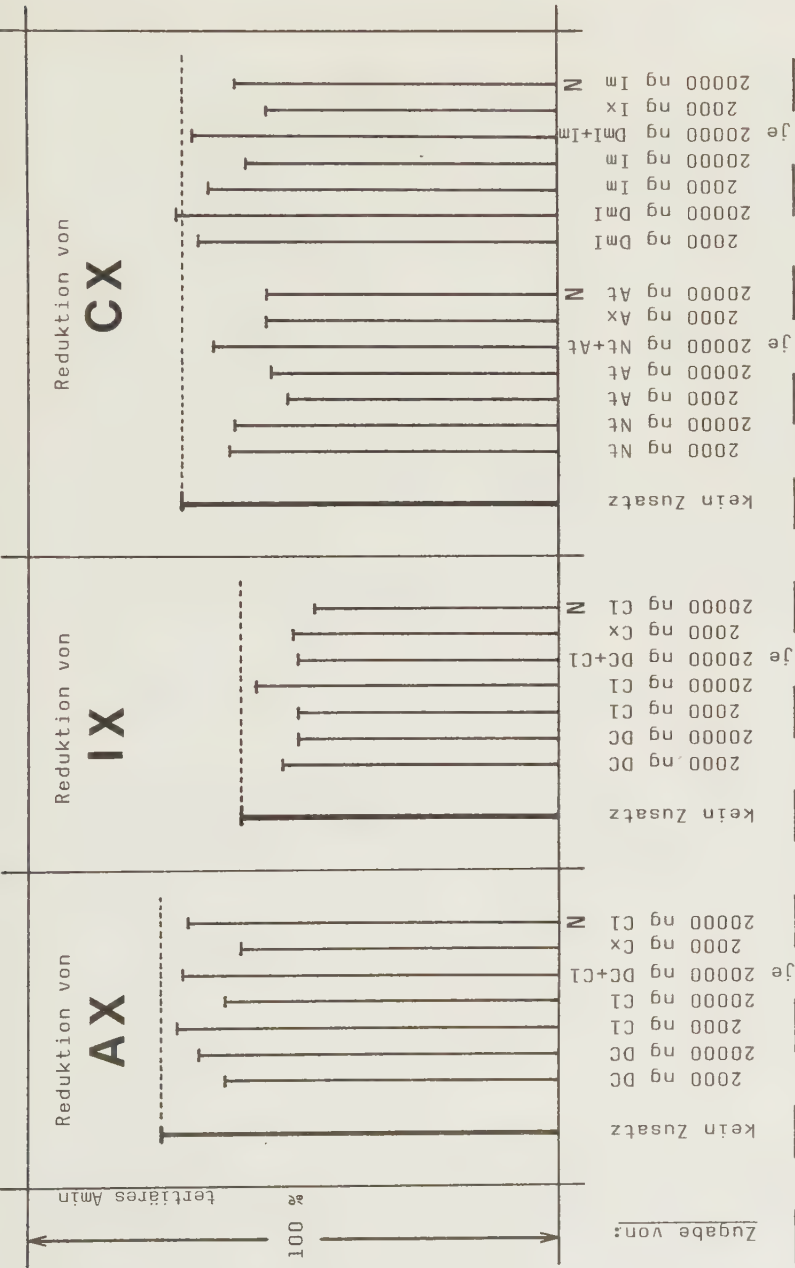


Abb. 5. Graphische Darstellung des meßbaren prozentualen Anteils der zum tertiären Amin (At, Im, Cl) reduzierten N-Oxide nach Inkubationen von 250 µl Hämolystat mit Ax bzw. Ix bzw. Cx unter Zugabe der angegebenen Mengen chemisch nahe verwandter Pharmaka.

N= Zugabe des chem. verwandten Pharmakons nach der Inkubation (vor der Extraktion).

In (fast) allen Fällen zeigt sich nach Zugabe verwandter Pharmaka zum Inkubationsansatz ein geringfügiger prozentualer Umsatzrückgang, jedoch ist kein quantitativer Zusammenhang zwischen dem Ausmaß dieser Umsatzverminderung und der Art oder Menge des zugesetzten Pharmakons ersichtlich. (s. Tab. 10 und Abb. 5).

Bemerkenswerterweise ist dieser geringfügige Umsatzrückgang auch dann festzustellen, wenn die Zugabe des verwandten Pharmakons erst nach der eigentlichen Inkubation (vor Beginn der Extraktion) erfolgt (s. die letzte, durch ein "N" gekennzeichnete Spalte in Tabelle 10 und die jeweils letzte Säule der Abbildung 5).

Bei dem Effekt könnte es sich also auch um eine Konkurrenz bei der Extraktion, oder die Hemmung einer eventuellen Weiterreaktion während der Extraktion handeln.

ZUSAMMENFASSUNG:

Nach Anwesenheit chemisch nahe verwandter Pharmaka im Inkubationsansatz eines N-Oxides wird bei der Analyse etwas weniger tertiäres Amin gefunden als in einer Vergleichsinkubation ohne Zusatz.

9.) - 11.) V e r d ü n n u n g e n

Die Verdünnung eines Erythrocyten-Hämolysates im Verhältnis 1 : 10 (bzw. 1 : 11 , s. u.) mit verschiedenen Medien führt zu deutlichen Effekten.

Zur Verdünnung verwendet wurden:

H₂O_{bidest.} ; 0,1 N HCl ; 0,1 N NaOH und Blut-Plasma.

Im folgenden sind die Experimente und deren Ergebnisse einzeln dargestellt.

9.1.) V e r d ü n n u n g v o n H ä m o l y s a t m i t H₂O .

In diesem ersten Verdünnungs-Experiment wurde ein Vergleich angestellt zwischen den Umsatzraten, die sich ergeben, wenn verschiedene Volumina Hämolysat zum einen unverdünnt und zum anderen in einer Verdünnung von 1 : 10 mit H₂O_{bidest.} mit Ax inkubiert werden.

VERSUCHSDURCHFÜHRUNG:

Ax-Mengen: 200 ng und 2.000 ng

Inkubationszeiten: 5 Minuten und 60 Minuten

Temperatur: 37°C

Die verwendeten Hämolysat-Volumina und die hergestellten Verdünnungen können dem folgenden Schema 3 entnommen werden.

Verdünnung :	unverdünnt		1 : 10		
enthaltene Hämolysat-Menge in μl	20	150	2	15	150
Gesamt-Volumen in μl (ohne Ax)	20	150	20	150	1.500
reale Verdünnung durch Zugabe von 10 μl Ax-Lösung	1:1,5		1:15		

Schema 3

ERGEBNISSE:

Ergebnisse in Nanogramm, s. Anhang, Tab. 47

Ergebnisse in Prozenten, s. Tab. 11.

Tabelle 11

Meßbarer prozentualer Anteil des zu At reduzierten Ax nach Inkubationen von 200 ng bzw. 2.000 ng Ax mit den angegebenen Hämolytat-Volumina, die z.T. unverdünnt, z.T. mit H₂O im Verhältnis 1:10 verdünnt verwendet wurden.

Verdünnung :	unverdünnt		1 : 10		
Hämolytatmenge in µl	20	150	2	15	150
Amitriptylin- Anteil in Prozenten	19	40	9	11	19

Die Werte für die beiden verschiedenen Ax-Mengen (200 ng und 2.000 ng) sowie für zwei unterschiedliche Inkubationszeiten (5 Minuten und 60 Minuten) wurden gemittelt, da sich nur geringe Unterschiede ergaben.

Zur Verdünnung des Hämolytates wurde H₂O bidest. verwendet.

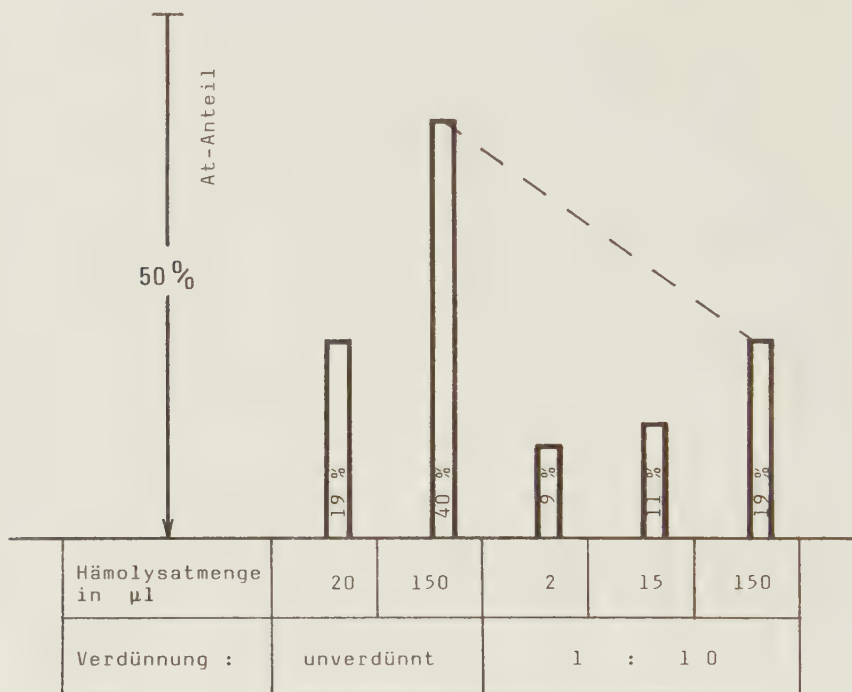


Abb. 6

Graphische Darstellung des meßbaren prozentualen Anteils des zu At reduzierten Ax nach Inkubationen von 200 ng und 2.000 ng Ax mit den angegebenen Hämolysat-Volumina, die z. T. unverdünnt, z. T. mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ im Verhältnis 1 : 10 verdünnt, verwendet wurden.

Die Werte für die beiden Ax-Mengen sowie für die zwei verschiedenen Inkubationszeiten (5 bzw. 60 Minuten) sind gemittelt, da sich nur geringe Unterschiede ergaben.

In dem dargestellten Fall sinkt der prozentuale Umsatz bei gleichbleibender Hämolysatmenge (150 μ l) von 40 % auf 19 %, wenn das Hämolysat 1:10 mit Wasser verdünnt wird.

Beim verdünnten Hämolysat nimmt der Umsatz mit steigender Hämolysatmenge zu (wie auch bei unverdünntem Hämolysat, siehe Versuche Nr. 4.) und Nr. 10.)).

Es ist möglich, daß sich die beiden gegensinnigen Einflüsse von Wasser-Zugabe und Steigerung der Hämolysatmenge gegenseitig aufheben:

So führen in diesem Beispiel die 150 μ l 1:10-verdünntes Hämolysat (Geamtvolumen also 1.500 μ l) zu einem etwa gleich hohen Umsatz, wie die 20 μ l unverdünntes Hämolysat.
(s. Tab. 11 und Abb. 6).

9. 2.) Verdünnung von HämolySAT mit HCL, NaOH und Blut-Plasma.

Die Umsatz-Effekte einer Verdünnung von HämolySAT im Verhältnis 1 : 11 mit HCL bzw. NaOH bzw. Blut-Plasma wurden je drei mal in unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten untersucht, bei denen jeweils alle drei Verdünnungsmedien zum Einsatz kamen. Um zu zeigen, daß die qualitativen Einflüsse (Umsatz-Veränderungen) aller Verdünnungen trotz der unterschiedlichen Ausgangspunkte (interindividuelle Variabilität zwischen den verwendeten HämolySATen, s. V. 3.), S. 39 ff.) gleich sind, werden alle drei Experimente dargestellt.

VERSUCHSDURCHFÜHRUNG:

Die drei Versuche liefen sehr ähnlich ab:

Stets wurde eine Verdünnung von frisch hergestelltem HämolySAT mit einem der Medien im Verhältnis 1 : 11 hergestellt und mit Ax inkubiert.

Parallel dazu erfolgte eine Inkubation von Ax mit unverdünntem HämolySAT, welches erst nach Ablauf der Inkubationszeit (also vor der Extraktion) in der gleichen Weise verdünnt wurde.

Zum Vergleich diente jeweils eine Inkubation von Ax mit HämolySAT ohne jede Verdünnung (Doppelbestimmungen).

Der genaue Versuchsablauf ist im folgenden Schema 4 dargestellt.

Ax-Menge : 2.000 ng

Temperatur : 37 ° C

SCHEMA ZUR VERSUCHSDURCHFÜHRUNG:

	VERSUCH A	VERSUCH B	VERSUCH C
µl Hämolysat	100	200	200
ml Medium (Verdünnung)	1	2	2
Versuchs- varianten	a) 60 Minuten unverdünnt inkubieren und extrahieren. b) 60 Minuten unverdünnt inkubieren und 1:11 verdünnt extrahieren. c) 60 Minuten 1:11 verdünnt inkubieren und extrahieren. d) 2 Minuten 1:11 verdünnt inkubieren und extrahieren.	a) wie Versuch A b) wie Versuch A c) wie Versuch A -----	a) wie Versuch A b) wie Versuch A c) wie Versuch A -----
Zur Extraktion	ALKALISIEREN	NICHT alkalisieren	NICHT alkalisieren

Schema 4

ERGEBNISSE:

Ergebnisse in Nanogramm, s. Anhang, Tab. 49.

Ergebnisse in Prozenten, s. Tab. 12.

Tabelle 12

Meßbare prozentuale Anteile des zu At und Nt reduzierten sowie des unveränderten Ax nach Inkubationen von 2.000 ng Ax mit den angegebenen Hämolytat-Volumina, wobei das Hämolytat in der angegebenen Weise z.T. mit HCl bzw. NaOH bzw. Blut-Plasma im Verhältnis 1:11 verdünnt worden war.

Versuch	Inkuba- tions- zeit in Minuten	Subs- tanz Ana- lyse	VERGLEICHs- Inkubation unverdünnt	V e r d ü n n u n g 1 : 11 m i t				
				0,1 N HCl pH 1,5	0,1 N NaOH pH 12,7	Blut-Plasma pH 7,4		
				vorher nachh.	vorher nachh.	vorher	nachh.	
A 100 µl Hämo- lysät A	2	Nt :		2	1	2		
		At :		10	21	94		
		Ax :		88	78	4		
B 100 µl Hämo- lysät B	60	Nt :	2	1	2	3	2	
		At :	26	8	95	92	95	
		Ax :	72	91	4	5	3	
C 100 µl Hämo- lysät C	60	Nt :	2	23	1	7	4	
		At :	80	28	99	93	96	
		Ax :	18	49	-	-	-	
		Nt :	2	18	2	3	3	
		At :	61	20	96	97	94	
		Ax :	37	62	2	-	3	

vorher = Verdünnung vor der Inkubation ; nachh. = Verdünnung nach der Inkubation

Verdünnung von Hämolysat mit 0,1 N HCl (: pH 1,5)

Salzsäure vermindert die im Hämolysat entstehende Amitriptylin-Menge auf die Hälfte bis ein Drittel des Vergleichswertes (unverdünntes Hämolysat), wenn es vor Beginn der Inkubation zugeführt wird (U n t e r d r ü c k u n g d e r N-Oxid-Reduktion). (s. Tab. 12 und Abb. 7).

Beachtenswerterweise ist aber auch dann eine Umsatzverminderung zu verzeichnen, wenn die Säure erst nach Ablauf der Inkubationszeit zugegeben wird. Diese ist zwar deutlich, aber stets weniger ausgeprägt als bei Verdünnung vor der Inkubation. Es könnte sich hierbei also um eine R ü c k r e a k t i o n ($At \rightarrow Ax$), oder um die U n t e r d r ü c k u n g einer eventuellen W e i t e r r e a k t i o n während der Extraktion handeln. (s. Tab. 12 und Abb. 7).

Auffallend ist weiterhin, daß bei den HCl-Verdünnungen der Versuche B und C ganz erhebliche Mengen von Nortriptylin (gestrichelter, oberer Teil der Säulen) gebildet wurden (etwa das 10fache der sonst üblichen Mengen), wobei die Summe von Nortriptylin und Amitriptylin jedoch immer noch niedriger ist, als das Amitriptylin allein in der Vergleichsinkubation. (s. Tab. 12 und Abb. 7).

Daß bei Versuch A keine derartig erhöhte Nortriptylin-Bildung auftrat liegt offenbar daran, daß dort vor der Extraktion eine Alkalisierung der Inkubationsansätze mit 0,1 N NaOH durchgeführt wurde. (Dies ist der einzige Unterschied zu den Versuchen B und C).

Damit liegt hier der einzige Fall vor, bei dem ein Einfluß der Alkalisierung auf das Versuchsergebnis festgestellt werden konnte (vgl. Abschnitt: "Versuche zur Methodik B.")).

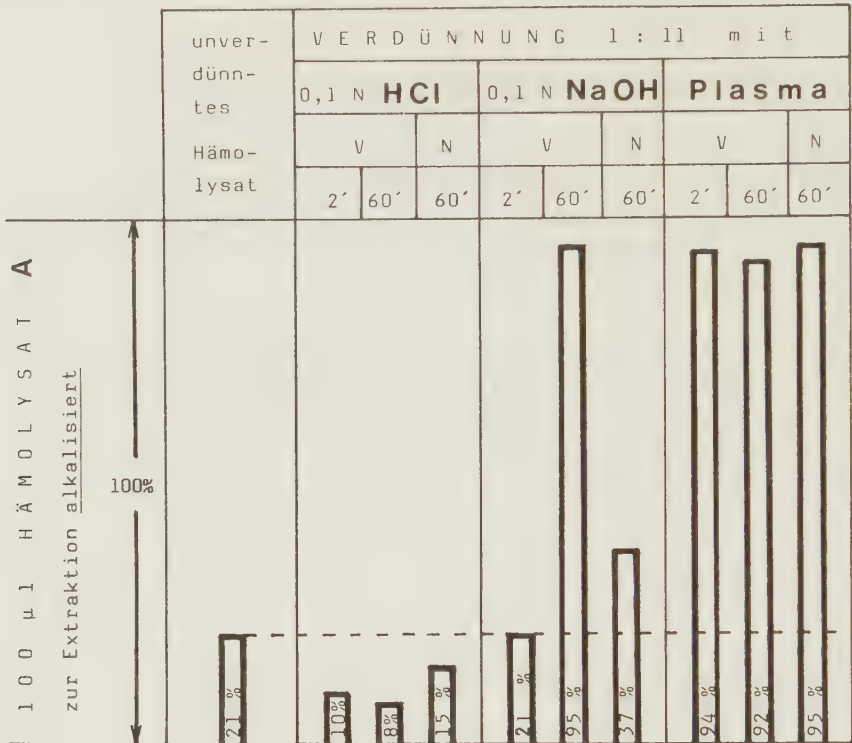


Abb. 7 (oben und nebenstehend)

Graphische Darstellung des meßbaren prozentualen Anteils des zu At (teilweise auch des zu Nt) reduzierten Ax nach Inkubationen von 2.000 ng Ax mit den angegebenen Hämolytat-Volumina, wobei das Hämolytat in der angegebenen Weise z.T. mit HCL bzw. NaOH bzw. Blut-Plasma in Verhältnis 1:11 verdünnt worden war.

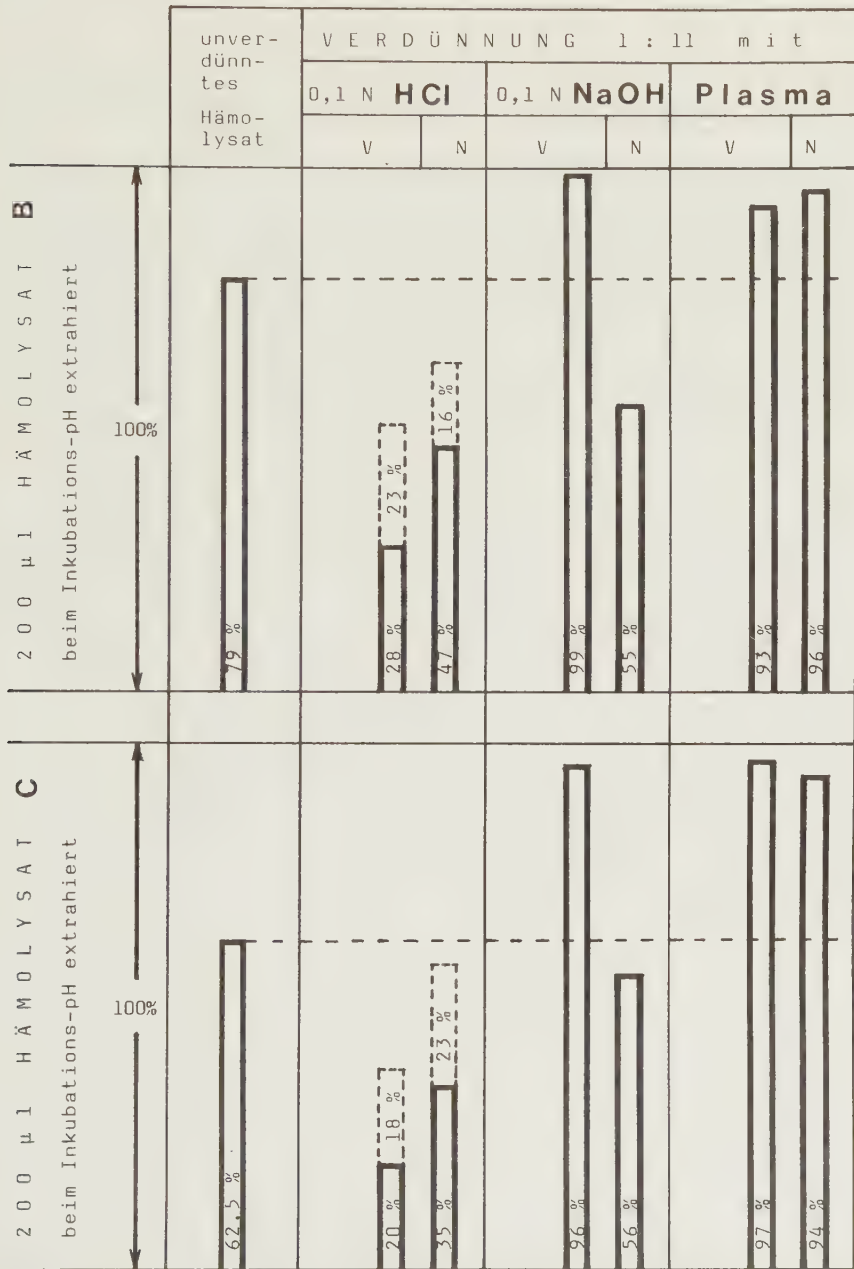
(Verdünnung 1:11 mit 0,1 N HCl : pH-Wert 1,5 ;

Verdünnung 1:11 mit 0,1 N NaOH : pH-Wert 12,7)

V = Verdünnung vor der Inkubation (vor der Ax-Zugabe)

N = Verdünnung nach der Inkubation (vor der Extraktion)

□ : Amitriptylin ; □ : Nortriptylin



Verdünnung von Hämolysat mit 0,1 N NaOH (: pH 12,7)

Bei vorheriger Verdünnung des Hämolysates mit NaOH und anschließender 60minütiger Inkubation ergibt sich in allen Fällen ein Umsatz von 95 % und mehr! Bei nur 2minütiger Inkubation oder NaOH-Zugabe nach der eigentlichen Inkubationszeit ist dies jedoch nicht der Fall:

Der 2-Minuten-Wert liegt in der Größenordnung der Vergleichs-inkubation, und bei der nachträglichen Verdünnung liegen die Amitriptylin-Anteile zwei mal unter und ein mal über dem Vergleichswert. (Das könnte damit zusammenhängen, daß die Zeit zwischen der nachträglichen NaOH-Zugabe und dem Beginn bzw. Ende der Extraktion aus technischen Gründen nicht ganz konstant gehalten werden konnte, zumal es sich um verschiedene Experimente handelt.) (s. Tab. 12 und Abb. 7).

Diese Befunde ließen sich durch die Annahme erklären, daß die NaOH-Verdünnung die Reduktions g e s c h w i n d i g k e i t verlangsamt, aber das Reaktionsgleichgewicht weit zu Gunsten einer vermehrten Amitriptylin-Bildung verschiebt. Die gegenüber der Vergleichsinkubation niedrigeren Amitriptylin-Werte bei nachträglicher Laugenzugabe in den Versuchen B und C könnten dann auf die Verlangsamung einer möglichen Weiterreaktion während der Extraktion zurückzuführen sein.

Verdünnung von Hämolysat mit Blut-Plasma

Bei allen Ansätzen, in denen Hämolysat mit Blut-Plasma verdünnt wurde, ergab sich eine Reduktionsrate des Ax von über 90 % ! In drei Fällen war überhaupt kein N-Oxid mehr nachweisbar (aber etwas Nortriptylin neben dem weit überwiegenden Amitriptylin). (s. Tab. 12 und Abb. 7). Dies gilt unabhängig von der Inkubationszeit und dem Zeitpunkt der Plasmazugabe, das heißt, auch nach nur zweiminütiger Inkubation, oder Beimengung des Plasmas erst nach der Inkubation (vor der Extraktion) ist diese fast vollständige Umsetzung des Amitriptylin-N-Oxids zum Amitriptylin zu beobachten. (s. Tab. 12 und Abb. 7). (Da Amitriptylin-N-Oxid, Amitriptylin und Nortriptylin aus Plasma etwa gleich gut extrahiert werden - siehe Abschnitt: Versuche zur Methodik 3.) - scheidet ein Extraktionsartefakt als Ursache dieses Effektes aus.)

ZUSAMMENFASSUNG:

Verdünnung von Hämolysat 1:10 bzw. 1:11 mit

Wasser : vermindert die N-Oxid-Reduktion deutlich.

HCl (pH 1,5) : vermindert den Umsatz ebenfalls.

NaOH (pH 12,7) : verlangsamt die Reaktion,
läßt sie aber fast 100 %-ig ablaufen.

Blut-Plasma : führt zu einer erheblichen Umsatzsteigerung.

Das Blut-Plasma ist das physiologischste unter den hier verwendeten Verdünnungs-Medien, und seine stark umsatzsteigernde Wirkung daher der interessanteste unter den beobachteten Verdünnungs-Effekten.

Aus diesem Grund wurden weitere Experimente durchgeführt, welche diesen Effekt genauer untersuchen sollten.

10.) Der Einfluß zugegebenen Plasmas.

Aufbauend auf die Ergebnisse von Versuch 9.2.) wurde Versuch 10.) so gestaltet, daß die Einflüsse des beigemengten Plasma-Volumens, des erreichten Verdünnungsgrades und des enthaltenen Hämolysat-Volumens (bei jeweils konstanten anderen Bedingungen) getrennt betrachtet werden können.

VERSUCHSDURCHFÜHRUNG:

je 2.000 ng Ax 60 Minuten bei 37°C inkubiert.

Die hergestellten Hämolysat-Plasma-Mischungen sind im folgenden Schema angegeben.

Hämolysat in µl	zugegebenes Blut-Plasma-Volumen in µl						
10	0	10	30	90	270	810	2.430
30	0	30	90	270	810	2.430	
90	0	90	270	810	2.430		
270	0	270	810	2.430			
Verdün- nungs- grad	unver- dünnt	1 : 2	1 : 4	1 : 10	1 : 28	1 : 82	2 : 244

Schema 5

ERGEBNISSE:

Ergebnisse in Nanogramm, s. Anhang, Tab. 51

Ergebnisse in Prozenten, s. Tab. 13.

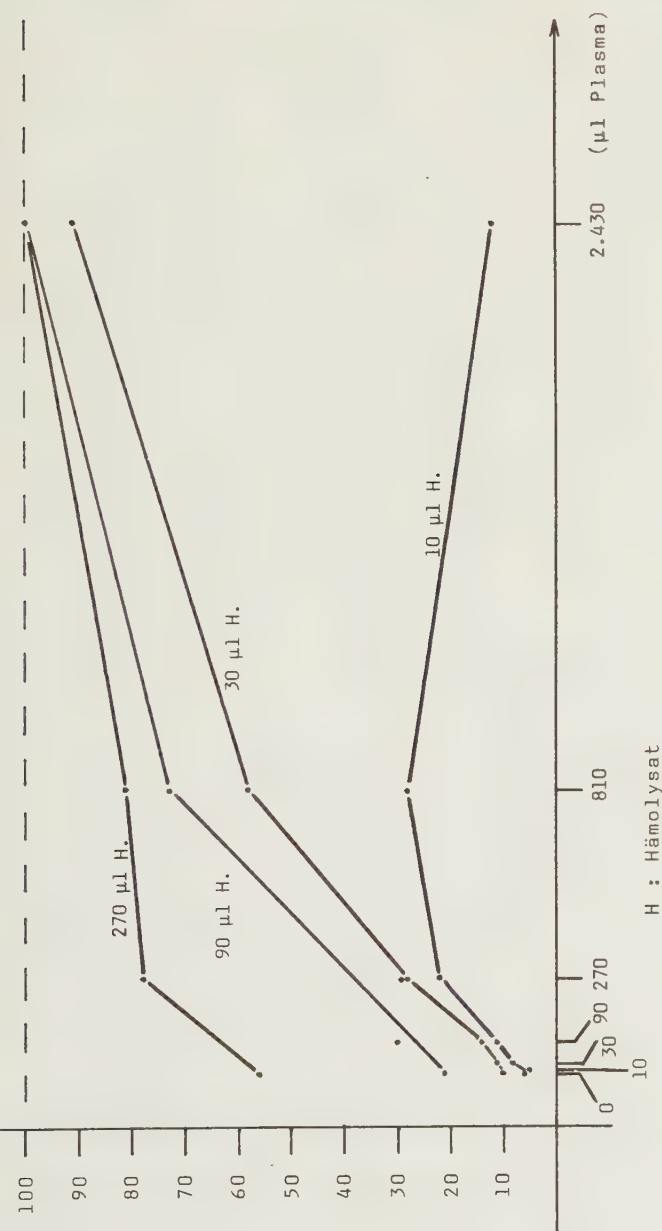


Abb. 8

Graphische Darstellung des meßbaren prozentualen Anteils des zu At reduzierten Ax nach Inkubationen von 2.000 ng Ax mit verschiedenen Hämolysat-Plasma-Gemischen.

Jede der Kurven zeigt die Abhängigkeit des Umsatzes (At-Anteils) in einem bestimmten Hämolysat-Volumen (bei den Kurven angegeben) von der Menge des zugegebenen Plasmas (auf der Abszisse angegeben).

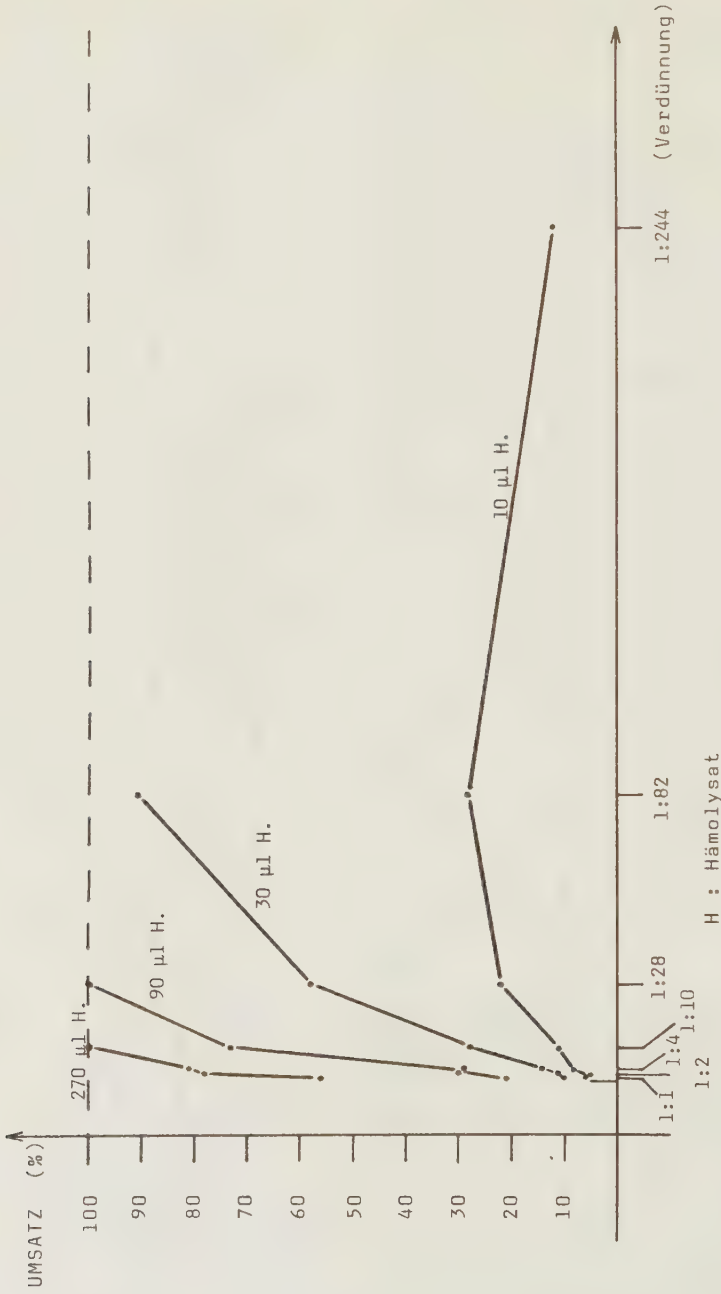


Abb. 9

Graphische Darstellung des meßbaren prozentualen Anteils des zu At reduzierten Ax (Umsatz) nach Inkubationen von 2.000 ng Ax mit verschiedenen Hämolyse-Plasma-Gemischen. Jede der Kurven zeigt die Abhängigkeit des Umsatzes in einem bestimmten Hämolyse-Volumen (bei den Kurven angegeben) vom Verdünnungsgrad (Abszisse) dieses Hämolyse mit den Verdünnungsmedium Blut-Plasma.

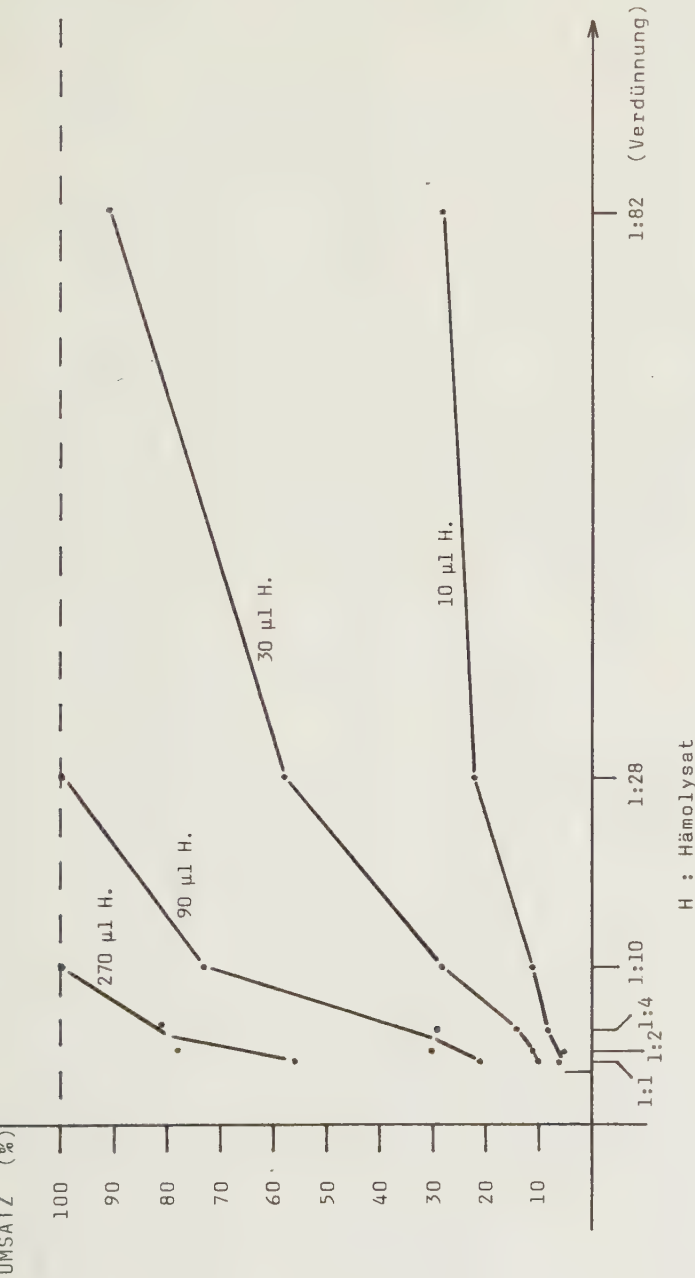


Abb. 10

Graphische Darstellung des meßbaren prozentualen Anteils des zu At reduzierten Ax (Umsatz) nach Inkubationen von 2.000 ng Ax mit verschiedenen Hämolytat-Plasma-Gemischen. Jede der Kurven zeigt die Abhängigkeit des Umsatzes in einem bestimmten Hämolytat-Volumen (bei den Kurven angegeben) vom Verdünnungsgrad (Abszisse) dieses Hämolytats mit dem Verdünnungsmedium Blut-Plasma. (Diese Abbildung ist bis auf den Maßstab der Abszisse mit Abb. 9 identisch.)

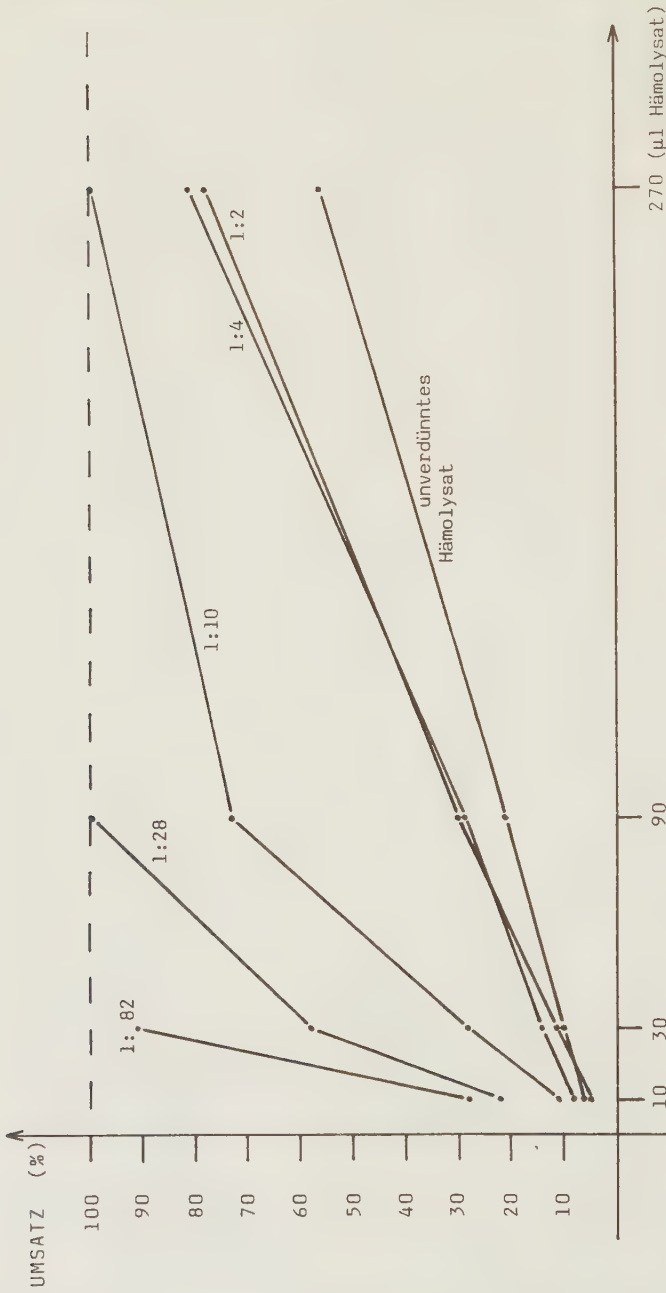


Abb. 11

Graphische Darstellung des meßbaren prozentualen Anteils des zu At reduzierten Ax (Umsatz) nach Inkubationen von 2.000 ng Ax mit verschiedenen HämolySAT-Plasma-Gemischen. Jede der Kurven zeigt die Abhängigkeit des Umsatzes (At-Anteils) in einem bestimmten Gemisch (der Verdünnungsgrad ist bei den Kurven angegeben) von der Menge des darin enthaltenen HämolySATs (und damit vom Gesamt-Volumen des HämolySAT-Plasma-Gemisches).

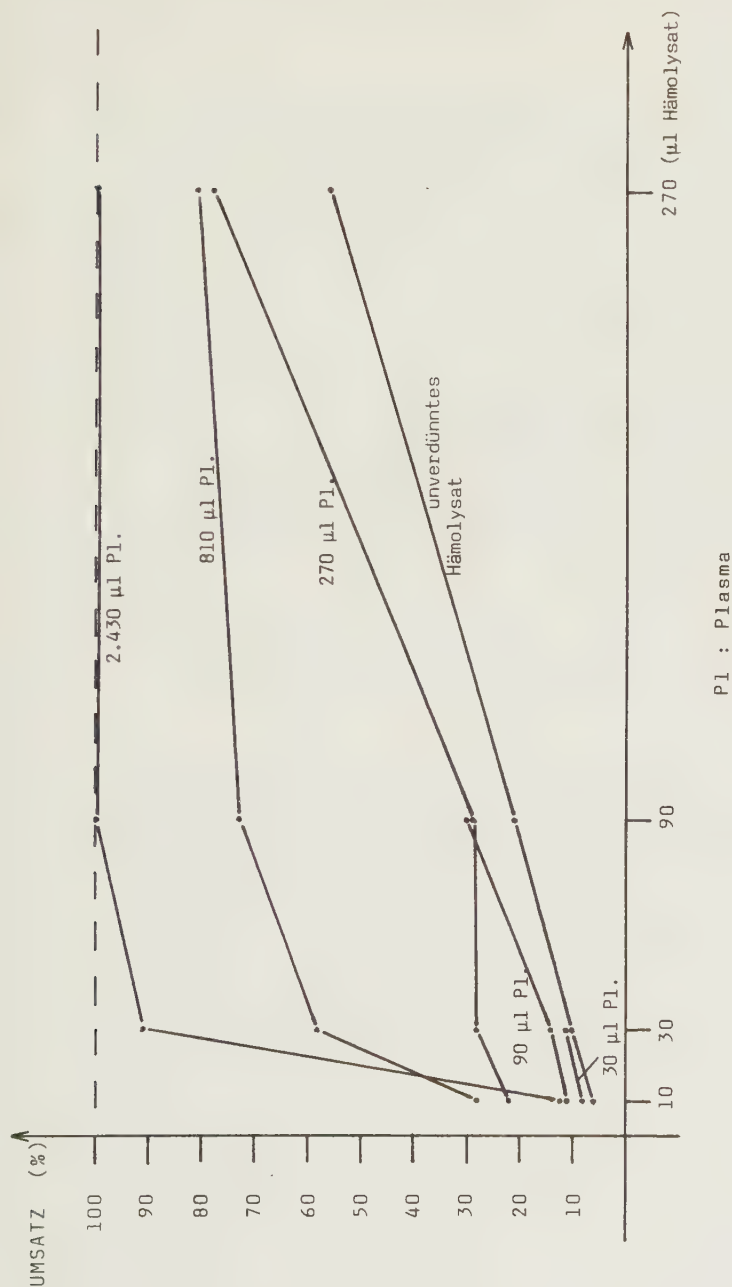


Abb. 12

Graphische Darstellung des meßbaren prozentualen Anteils des zu At reduzierten Ax (Umsatz) nach Inkubationen von 2.000 ng Ax mit verschiedenen Hämolyt-Plasma-Gemischen. Jede der Kurven zeigt die Abhängigkeit des Umsatzes in Gemischen mit einem bestimmten Plasma-Volumen (bei den Kurven angegeben) von der Menge des darin enthaltenen Hämolyts.

Es treten abhängig von Hämolysatmenge und Blut-Plasma-Menge Umsätze (Amitriptylin-Anteile) zwischen 5 % und 100 % auf.

Folgende Zusammenhänge lassen sich erkennen:

a) Der Einfluß der Blut-Plasma-Menge

(s. Tab. 13 und Abb. 8)

Zugabe steigender Plasma-Mengen zu gleichbleibenden Hämolysat-Mengen führt zu steigendem Umsatz.

Die Kurven verlaufen anfangs annähernd linear und auch parallel. D. h.: Ausgehend von verschiedenen hohen prozentualen Umsätzen (bei unterschiedlichen - unverdünnten - Hämolysatmengen) gilt (in diesem parallelen Bereich): Zugabe gleicher Plasma-Mengen führt zu gleich hohen Umsatzsteigerungen (nicht Umsätzen!), unabhängig von der zugrunde liegenden Hämolysatmenge (und damit unabhängig vom bereits erreichten Umsatz und dem vorliegenden Verdünnungsgrad).

Wie die 10 µl-Kurve zeigt - dort geht der Umsatz zwischen den Verdünnungen 1:82 und 1:244 wieder zurück - gelten diese Aussagen natürlich nur in Grenzen. Auch bei den anderen Kurven (höhere Hämolysatmengen) ist damit zu rechnen, daß der Umsatz, der 100 % erreichte bei weiterer Verdünnung wieder bis auf Null zurückgeht, da im Extremfall einer unendlichen Verdünnung nur noch Plasma vorläge, welches allein keinerlei N-Oxid-Reduktion verursacht (s. V.l.).

b) Der Einfluß des Verdünnungsgrades

(s. Tab. 13 sowie Abbildungen 9 und 10)

Zunehmende Verdünnung einer konstanten Hämolysatmenge mit Blut-Plasma führt zu steigenden Umsätzen. (Für gegen Unendlich gehende Verdünnungen gelten die gleichen Einschränkungen wie unter a).)

Die Kurven laufen fächerförmig auseinander, das heißt : Je größer die Hämolysatmenge ist, von der ausgegangen wird, desto größer ist die Umsatzsteigerung, die durch Verdünnung bis zu einem bestimmten Mischungsverhältnis bewirkt wird. (Weil bei einer größeren Hämolysatmenge auch eine größere Plasma-Menge zum Erreichen eines bestimmten Verdünnungsgrades nötig ist.)

c) Der Einfluß der Hämolysatmenge

(s. Tab. 13 und Abbildungen 11 und 12)

Beim unverdünnten Hämolysat nimmt die N-Oxid-Reduktion mit steigender Hämolysatmenge etwa linear zu (vgl. V. 4.); die Geraden in den Abbildungen 4, 11 und 12 sind identisch). Auch bei den Hämolysat-Plasma-Gemischen steigt der Umsatz mit der Hämolysatmenge. Es gilt :

- (1) Bei konstantem Verdünnungsverhältnis (Abb. 11) ist diese Zunahme mit der Hämolysatmenge anfangs annähernd linear und um so stärker, je höher die Verdünnung ist (weil bei höheren Verdünnungen auch mehr Plasma zum Einsatz kommt).
- (2) Bei gleichbleibenden Plasma-Mengen (Abb. 12) verlaufen die Kurven auch z.T. anfangs linear und in einem kleineren Bereich ungefähr parallel. In diesem Bereich führt also die Zugabe gleicher Hämolysatmengen zu gleich hohen Umsatzsteigerungen (bei Plasma-Volumina von 0 μ l bis 2.430 μ l).

ZUSAMMENFASSUNG:

Verdünnung einer gegebenen HämolySATmenge mit steigenden Volumina Blut-Plasma führt zu steigendem Umsatz, bis dieser 100 % erreicht.

Aber auch eine Zunahme der HämolySates in einem HämolySAT-Blutplasma-Gemisch steigert den Umsatz.

Daß trotz der interessanten Wirkungen des Blut-Plasmas auf die N-Oxid-Reduktion in HämolySAT letzteres für die Reaktion entscheidend ist, zeigt das folgende Experiment.

11.) Schrittweiser Ersatz von
Hämolysat durch Blut-Plasma.

Hämolysat-Plasma-Gemische von zunehmendem Verdünnungsgrad aber gleichbleibendem Gesamtvolumen wurden mit Amitriptylin-N-Oxid inkubiert.

VERSUCHSDURCHFÜHRUNG:

Gesamtvolumen: Hämolysat + Plasma jeweils 200 µl
je 2.000 ng Ax
je 35 Minuten bei 37°C inkubiert .

Es wurden Mischungen hergestellt, in denen Hämolysat in folgenden Verhältnissen mit Blut-Plasma verdünnt war :

1	:	1	(unverdünntes Hämolysat)
1	:	10	
1	:	100	
1	:	1.000	
1	:	10.000	
1	:	100.000	
1	:	1.000.000	

ERGEBNISSE:

Ergebnisse in Nanogramm, s. Anhang, Tab. 53 .

Ergebnisse in Prozenten, s. Tabelle 14 .

Tabelle 14

Meßbarer prozentualer Anteil des zu At reduzierten Ax nach Inkubationen von Hämolytat-Plasma-Gemischen, bei denen
 - ausgehend von 200 µl unverdünntem Hämolytat - bei gleichbleibendem Volumen (200 µl) das Hämolytat schrittweise durch Plasma ersetzt wird mit Ax.

V e r d ü n n u n g s v e r h ä l t n i s							
Hämolytat : Plasma							
	1 : 1	1 : 10	1 : 100	1 : 1000	1 : 10000	1 : 100000	1 : 1 Mio.
At Anteil in %	49	17	8	1	1	0	0

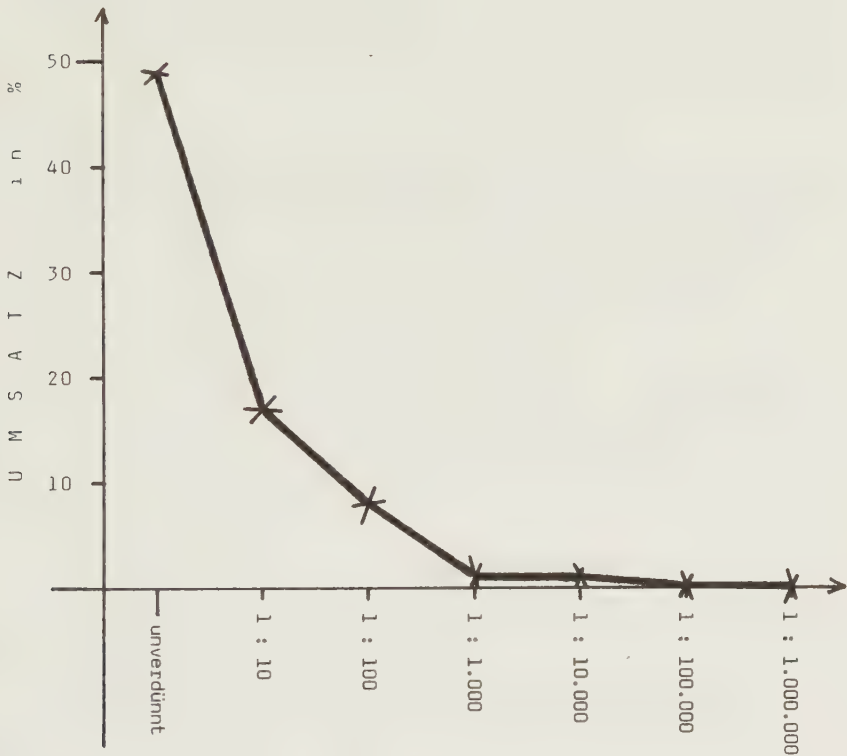


Abb. 13

Graphische Darstellung des meßbaren prozentualen Anteils des zu At reduzierten Ax (Umsatz) nach Inkubationen von Ax mit Hämolysat-Plasma-Gemischen, bei denen - ausgehend von 200 µl unverdünntem Hämolysat - bei gleichbleibendem Gesamtvolumen (200 µl) das Hämolysat schrittweise durch Plasma ersetzt wird.

Bei gleichbleibendem Gesamtvolumen eines Hämolysat-Plasma-Gemisches nimmt die Reduktionsrate mit zunehmendem Verdünnungsgrad ab und nähert sich dem Null-Wert reinen Blut-Plasmas (vgl. V. 1.).

Der umsatzsteigernde Effekt zugegebenen Plasmas kann also
- zumindest bei den hier verwendeten Volumina - einen gleichhohen Verlust von Hämolysat nicht ausgleichen.

ZUSAMMENFASSUNG:

Schrittweiser Ersatz von Hämolysat durch Blut-Plasma führt zu einem Umsatzrückgang, schließlich bis auf 0 % .

Für die in vivo-Bestimmung der Metabolite von Amitriptylin-N-Oxid ist zu folgern : Es ist wichtig

- auf eine Erythrocyten-schonende Blutabnahme mit dicken Kanülen zu achten ("abtropfen lassen") um die Hämolyse möglichst gering zu halten.
- die Blutabnahme nicht zu früh nach der N-Oxid-Gabe vorzunehmen, weil sonst die noch hohe Plasma-Ax-Konzentration durch eine in-vitro-Reduktion den gemessenen At-Wert erheblich nach oben verfälschen könnte.

II. EXPERIMENTE MIT INTAKTEN ERYTHROCYTEN

Im Gegensatz zu den Versuchen mit Hämolysat sind bei diesen Experimenten mit Suspensionen intakter roter Blutzellen in Blut-Plasma (entsprechend Vollblut, siehe Abschnitt "Materialien und Methoden", S. 21) oder Puffer (PBS-Puffer, plasmaisoton, pH 7,4) neben der Reduktion von N-Oxiden noch einige andere Phänomene zu beachten :

- a) Die Verteilung der Gesamtmenge von Ax + At zwischen den Erythrocyten und dem sie umgebenden Medium.
- b) Die davon abweichende Verteilung der einzelnen Substanzen zwischen den beiden Kompartimenten.
- c) Der zeitliche Ablauf dieser Verteilungsvorgänge.

Zur richtigen Beurteilung der Versuchsergebnisse muß vorausgesetzt werden, daß die beiden gemeinsam inkubierten, aber getrennt extrahierten und analysierten Kompartimente - Erythrocyten und Blut-Plasma - die gleiche Extraktionsausbeute liefern.

Vorversuche (die nicht im einzelnen dargestellt sind) bestätigten, daß die Extraktion sowohl von Plasma als auch von Erythrocyten-Hämolysat (hergestellt aus den intakt inkubierten Erythrocyten) jeweils eine Ausbeute von ca. 50 % (meist zwischen 45 % und 55 %) ergibt, die innerhalb eines Experimentes recht konstant ist. (Siehe dazu auch Versuch 13.) "Weitere Versuche mit Erythrocyten in Puffer".)

Die Versuche wurden wieder mit dem Blut verschiedener, freiwilliger Versuchspersonen durchgeführt. Wenn Blut mehrerer Personen in Parallelversuchen verwendet wird, ergeben sich große interindividuelle Unterschiede. (s. Tab. 15) Daher sind alle Ergebnisse auch dieses Abschnitts in erster Linie als qualitative Aussagen zu verstehen. Dort wo Ergebnisse von verschiedenen Versuchspersonen vorliegen, sind der Mittelwert und die Streubreite angegeben.

Allgemeine Ergebnisse der Versuche mit intakten Erythrocyten.

Bevor die Ergebnisse der einzelnen Experimente ausführlich dargestellt werden, soll hier zunächst ein Überblick über die Pharmakon-Verteilung zwischen Erythrocyten und Plasma sowie über das Ausmaß der N-Oxid-Reduktion unter Normalbedingungen gegeben werden, Vorgänge, die bei allen Experimenten auftreten.

Dadurch wird der weite Bereich deutlich, innerhalb dessen die Ergebnisse der verschiedenen Versuche liegen (inter-individuelle Variabilität).

Dies erst ermöglicht eine angemessene Beurteilung der Resultate einzelner Experimente in den weiteren Abschnitten dieser Arbeit und eine Trennung der allgemeingültigen Prinzipien vom speziellen Ergebnis des Einzelfalls.

Dazu dient die Zusammenfassung von dreizehn Experimenten in Tabelle 15 und die anschließende Besprechung.

VERSUCHSDURCHFÜHRUNGEN:

Vollblut-Volumina	:	1,0 ml	-	2,5 ml
Amitriptylin-N-Oxid-Mengen	:	200 ng	-	5.000 ng
Inkubationszeiten	:	15 min.	-	100 min.
Inkubationstemperatur	:	37 ° C		

Meist Doppelbestimmungen.

Genaue Versuchsbedingungen siehe Tabelle 15.

Die Uneinheitlichkeit der Versuchsdurchführungen beruht darauf, daß die Experimente an verschiedenen Tagen und unter einer jeweils anderen Fragestellung (s. die letzte Spalte in Tab. 15) gemacht wurden und hier nur der Übersicht wegen zusammengefaßt sind.

Tabelle 15

Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse von dreizehn Experimenten, bei denen Vollblut (HK-Wert: 50 %) mit Ax inkubiert worden war.

NR.	(1) Meßbarer prozentualer Anteil von At und Ax in jedem der beiden Kompartimente einzeln:				(2) Meßbarer prozentualer Anteil von At und Ax im gesamten Vollblut (Erys + Plasma):			
	ERYTHROCYTEN		PLASMA		ERYTHROCYTEN		PLASMA	
	AT	AX	AT	AX	AT	AX	AT	AX
1	39	61	4	96	3	4	4	89
2	28	72	2	98	3	8	2	87
3	35	65	3	97	5	9	2	84
4	94	6	18	82	18	1	13	68
5	76	24	1	99	8	3	1	88
6	51	49	1	99	10	10	1	79
7	67	33	1	99	11	5	1	83
8	52	48	2	98	11	10	2	77
9	25	75	0	100	11	33	0	56
10	51	49	0	100	9	8	0	83
11	72	28	1	99	21	8	1	70
12	9	91	4	96	2	19	3	76
13	79	21	2	98	18	5	1	76
DURCH-SCHNITT:	52	48	3	97	10	10	2	78

Die dreizehn Experimente wurden an verschiedenen Tagen und unter verschiedenen Fragestellungen durchgeführt. Daher sind die Versuchsbedingungen uneinheitlich und werden in den entsprechenden Spalten der Tabelle angegeben.

Angegeben ist der meßbare prozentuale Anteil des zu At reduzierten Ax in den beiden Vollblut-Kompartimenten: Erythrocyten und Plasma. (Einzelheiten, s. die obere Reihe der Tabelle.)

(3) Verteilung der Gesamtsubstanz (At + Ax) zwischen Erythrocyten und Plasma (errechnet aus Spalte (2).)		(4) Meßbarer prozentualer Anteil von At bzw. Ax in (Erythrocyten + Plasma) (errechnet aus Spalte (2).)		Versuchsbedingungen			Anzahl der Bestimmungen	vgl.
ERYS	PLASMA	AT	AX	Vollblutmenge (ml)	Menge von Ax (ng)	Inkubationszeit (min.)		
7	93	7	93	2,5	5.000	60	1	12.)
11	89	5	95	2,5	5.000	60	1	12.)
14	86	7	93	2,5	5.000	60	1	12.)
19	81	31	69	1,0	200 2.000	60	4	13.)
12	88	9	91	1,0	2.000	60	2	14.)
20	80	11	89	1,0	5.000	60	1	15.)
16	84	12	88	1,0	2.500	30	2	17.)
21	79	13	87	1,0	2.000 10.000	20	2	18.)
44	56	11	89	11 ml + 100 mg 40 µl analysiert		15	2	19.)
17	83	9	91	1,0	2.000	30	2	20.)
29	71	22	78	1,0	5.000	60	2	21.)
21	79	5	95	0,2	2.000	60	2	----
23	77	19	81	1,0 8,0	2.000 10.000	100	2	----
20	80	12	88					

Sind die angegebenen Werte solchen Versuchen entnommen, die an anderer Stelle in dieser Arbeit genauer beschrieben werden, so ist die Nummer des betreffenden Versuchs in der letzten Spalte der Tabelle ("vgl.") genannt.

Die Werte der meisten Versuche sind das Mittel aus den Ergebnissen mehrerer Ansätze vom Blut einer Person. Innerhalb eines Versuches waren der Resultate stets sehr einheitlich, doch zeigen sich starke Unterschiede zwischen den Experimenten.

Sie sind Ausdruck der großen interindividuellen Variabilität zwischen dem Blut verschiedener Personen.

Bei der späteren Beurteilung einzelner Versuchsergebnisse muß diese Unterschiedlichkeit berücksichtigt werden.

Die Uneinheitlichkeit der Versuchsdurchführungen läßt sich als Ursache dieser Variabilität ausschließen:

Die Versuchsergebnisse korrelieren mit keinem der Parameter: Blutvolumen , Ax-Menge , Inkubationszeit (s. Tab. 15).

Besprechung von Tabelle 15 :

Verteilung der Gesamtsubstanzmenge (Ax + At) im Blut

Bei Zugabe von Amitriptylin-N-Oxid in Vollblut (HK: 50 %) findet man - nach einer ausreichenden Inkubationszeit (bei 37°C wenige Minuten) - durchschnittlich ca. 20 % (7 % - 44 %) der Gesamtsubstanz in den roten Blutzellen wieder. Dieser Anteil befindet sich offenbar im Erythrocyten-Cytoplasma, denn nach Abzentrifugieren der Erythrocyten-Membranen bei ca. 20.000 G ist in der Membranfraktion kein Pharmakon nachweisbar, sondern alles At und Ax befindet sich im Überstand (Versuch nicht im Detail dargestellt). Die restlichen etwa 80 % der eingesetzten Pharmakonmenge verbleiben im Blut-Plasma.

Amitriptylin-N-Oxid-Reduktion

Innerhalb der Erythrocyten wird im Mittel etwa die Hälfte (9 % - 94 % !) des dort befindlichen N-Oxids zum Amitriptylin reduziert. Im Plasma (in dem ja kein Umsatz stattfindet, s. Versuch 1.)) liegen dagegen nur etwa 3 % (meist sogar weniger: 0 % - 4 %) der Gesamtsubstanz als Amitriptylin vor.

Die Erythrocyten scheinen also das in ihnen gebildete Amitriptylin in irgend einer Weise zu binden und nicht an das umgebende Plasma abzugeben (zumindest bis zu einer Inkubationszeit von 100 Minuten).

Daher trägt das Amitriptylin im Plasma kaum etwas zum Gesamtumsatz (tertiäres Amin in Erythrocyten + Plasma) bei, und dieser liegt nur geringfügig über dem Anteil des intraerythrocytären Amitriptylins an der Gesamtsubstanz (At + Ax in Erythrocyten + Plasma).

Die Erythrocyten sind jedoch nicht der Wirkort des in ihnen gebildeten Amitriptylins. Dieses kann also nur dann für den Wirkungsmechanismus des Medikaments und für seinen Metabolismus von Bedeutung sein, wenn es aus den Erythrocyten ins Plasma übertritt.

Verteilung von Amitriptylin-N-Oxid und Amitriptylin

Das inkubierte Amitriptylin-N-Oxid und das daraus entstandene Amitriptylin haben also eine völlig unterschiedliche Verteilung:

Das N-Oxid befindet sich überwiegend (zu ca. 80 %) im Blut-Plasma,

Amitriptylin dagegen vor allem (zu ca. 90 %) innerhalb der Erythrocyten.

Interindividuelle Variabilität

Besonders auffallend sind die großen Unterschiede zwischen den Ergebnissen, wenn das Blut verschiedener Personen zur Inkubation verwendet wird. Diese bereits oben erwähnte interindividuelle Variabilität ist auf der folgenden Seite zur Veranschaulichung graphisch dargestellt. (Abb. 14)

Die daran anschließende Abbildung (Abb. 15) verdeutlicht Verteilung und Umsatz, wie sie sich im Durchschnitt aus Tabelle 15 ergeben.

Darstellungen dieser Art werden in den folgenden Abschnitten noch des öfteren zur Veranschaulichung der Versuchsergebnisse verwendet.

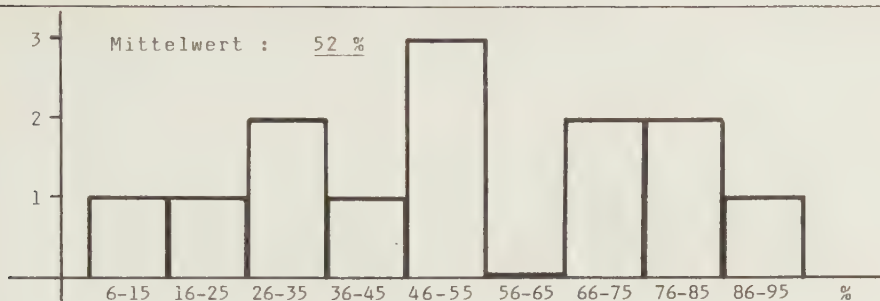


Abb. 14 A . Der unterschiedliche prozentuale Anteil des innerhalb der Erythrocyten als At meßbaren Pharmakons (Umsatz) nach 13 verschiedenen Inkubationen von Vollblut (HK-Wert 50 %) mit Ax und die relative Häufigkeit der gefundenen Umsätze. (vgl. Tab. 15)

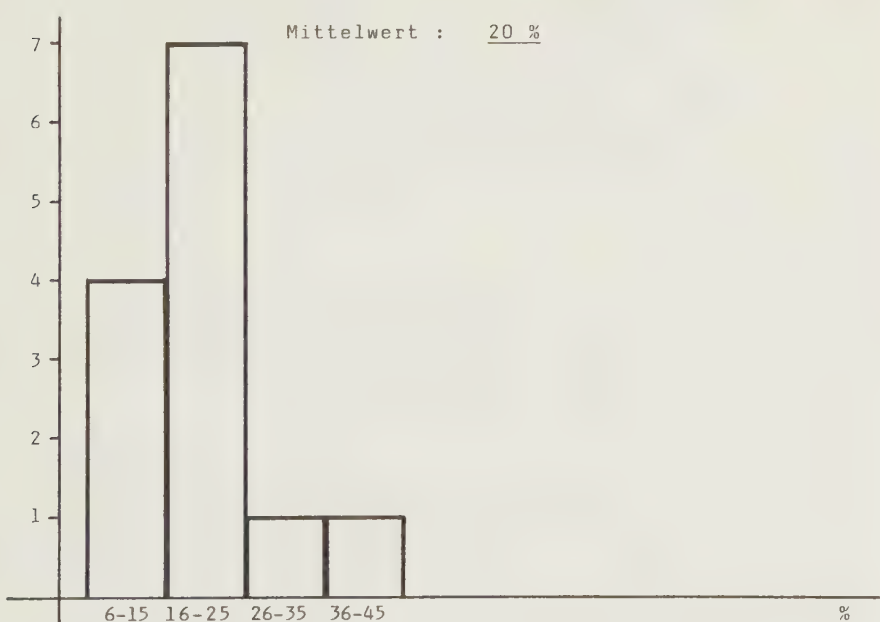


Abb. 14 B . Der unterschiedliche prozentuale Anteil der meßbaren Gesamtsubstanz (Ax + At in Erythrocyten + Plasma) der innerhalb der Erythrocyten gefunden wird sowie die relative Häufigkeit einzelner intraerythrocytärer Substanzanteile nach 13 verschiedenen Inkubationen von Vollblut (HK-Wert 50 %) mit Ax. (vgl. Tab. 15)

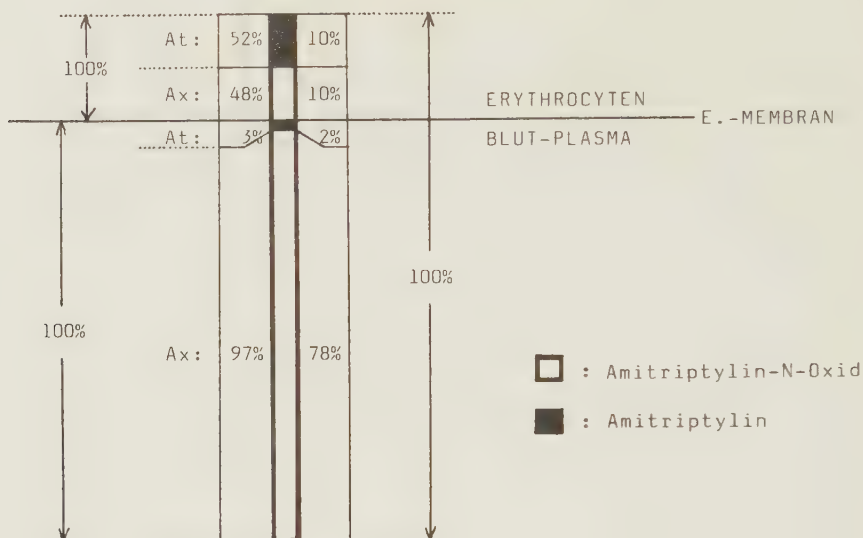


Abb. 15

Graphische Darstellung der Durchschnittswerte des meßbaren prozentualen Anteils von At und Ax sowohl in der Erythrocyten als auch im Plasma nach Inkubationen von Vollblut (13 unabhängige Versuche) mit Ax. (vgl. Tab. 15)

Die Gesamthöhe der abgebildeten Säule symbolisiert die 100 % der Gesamtsubstanz :

Ax + At in Erythrocyten + Plasma

Durch den Querstrich, der die Erythrocyten-Membran versinnbildlicht, wird sie in den intraerythrocytären Anteil (oben) und den plasmatischen Anteil (unten) geteilt.

Innerhalb beider Kompartimente bedeutet der weiße Säulenabschnitt das (zugegebene) Amitriptylin-N-Oxid und der schwarze Säulenabschnitt das (entstandene) Amitriptylin.

Von diesen 100 % können die Prozentanteile der einzelnen Kompartimente und Metaboliten errechnet werden (Prozentangaben auf der rechten Seite der Säule).

Um den Anteil des zu At reduzierten Ax innerhalb eines Kompartimentes zu erhalten wird zunächst die Gesamtsubstanz (Ax + At) innerhalb dieses Kompartimentes gleich 100 % gesetzt und dann davon der Anteil der einzelnen Metabolite berechnet (Prozentangaben auf der linken Seite der Säule).

12.) Interindividuelle Variabilität
und Unterschiede zwischen ver-
schiedenen N-Oxiden innerhalb
eines Experimentes.

In diesem Versuch wurde das Blut von drei verschiedenen Personen jeweils mit drei verschiedenen N-Oxiden (Amitriptylin-N-Oxid, Imipramin-N-Oxid, Chlorimipramin-N-Oxid) inkubiert. Damit sollten :

- a) die starken Unterschiede zwischen den Ergebnissen von Versuchen, die mit jeweils einem anderen Blut durchgeführt wurden, innerhalb eines Experimentes (absolut identische Behandlung aller Ansätze) verifiziert werden und geprüft werden, ob sie bei allen drei N-Oxiden gleichermaßen auftreten.
- b) Unterschiede in der Verteilung und / oder der Reduktionsrate zwischen den drei nahe verwandten N-Oxiden festgestellt werden.

VERSUCHSDURCHFÜHRUNG:

je 2,5 ml Vollblut (HK-Wert: 50 %) mit
je 5.000 ng N-Oxid (Ax / Ix / Cx)
bei 37 ° C 60 Minuten inkubiert .

ERGEBNISSE:

Ergebnis-Tabellen mit Angabe der Nanogramm, der Prozentanteile für jedes Kompartiment einzeln sowie der Substanzverteilung und des Gesamtumsatzes,
s. Anhang, Tabellen 54 bis 58 .

Ergebnisse in Prozenten, für Erythrocyten und Plasma gemeinsam, s. Tabelle 16 .

Tabelle 16

Prozentualer Anteil der als tertiäres Amin (At, Im, Cl) bzw. als N-Oxid (Ax, Ix, Cx) in Erythrocyten bzw. Plasma meßbaren Pharmakons nach Inkubationen von 2,5 ml Vollblut dreier verschiedener Probanden mit 5.000 ng eines der drei N-Oxide Ax, Ix oder Cx. Inkubationszeit: 60 Minuten.

(At + Ax in Erythrocyten + Plasma = 100 %)

Inkubation von	Analyse	Blut 1		Blut 2		Blut 3		Mittel <u>E</u>
		E	Pl	E	Pl	E	Pl	
AX	At	3	4	3	2	5	2	4
	Ax	4	89	8	87	9	84	
IX	Im	2	4	8	2	7	5	6
	Ix	8	86	10	80	13	75	
CX	Cl	1	1	3	2	6	2	3
	Cx	5	93	4	91	5	87	
Mittelwert der tertiären : Amine		2		5		6		

Mittel E : Mittelwert des bei den drei Probanden gemessenen intraerythrocytären tertiären Amins nach Inkubation des jeweils gleichen N-Oxides mit dem Blut der drei Personen.

Mittelwert der tertiären Amine : Mittelwert des nach Inkubation der drei verschiedenen N-Oxide mit dem Blut jeweils des gleichen Probanden gemessenen intraerythrocytären tertiären Amins.

Diese Mittelwerte wurden gebildet, um den Einfluß des Blutes (interindividuelle Variabilität) und den Einfluß des N-Oxids (chemische Unterschiede der N-Oxide) auf das Ausmaß der N-Oxid-Reduktion getrennt betrachten zu können.

Es zeigen sich deutliche interindividuelle Unterschiede, die jedoch keinen so weiten Bereich umfassen, wie die Experimente, die in Tabelle 15 zusammengestellt sind.

Auch zwischen den drei N-Oxiden sind Unterschiede festzustellen.

a) Substanzverteilung

(s. auch Abbildungen 16 und 17 sowie Anhang, Tab. 57)

Für alle drei N-Oxide gilt :

Die Erythrocyten des Blutes 1 nehmen am wenigsten, die des Blutes 3 am meisten Pharmakon (N-Oxid + tertiäres Amin) aus dem Plasma auf.

Für jedes Blut gilt :

Chlorimipramin-N-Oxid geht zu einem geringeren , Imipramin-N-Oxid dagegen zu einem höheren Prozentsatz in die roten Blutzellen hinein als das Amitriptylin-N-Oxid.

In Abbildung 17 kann der Einfluß des Blutes und der des N-Oxides auf die Substanzverteilung getrennt betrachtet werden, da dort einmal über die drei N-Oxide und einmal über die drei Probanden gemittelt wurde.

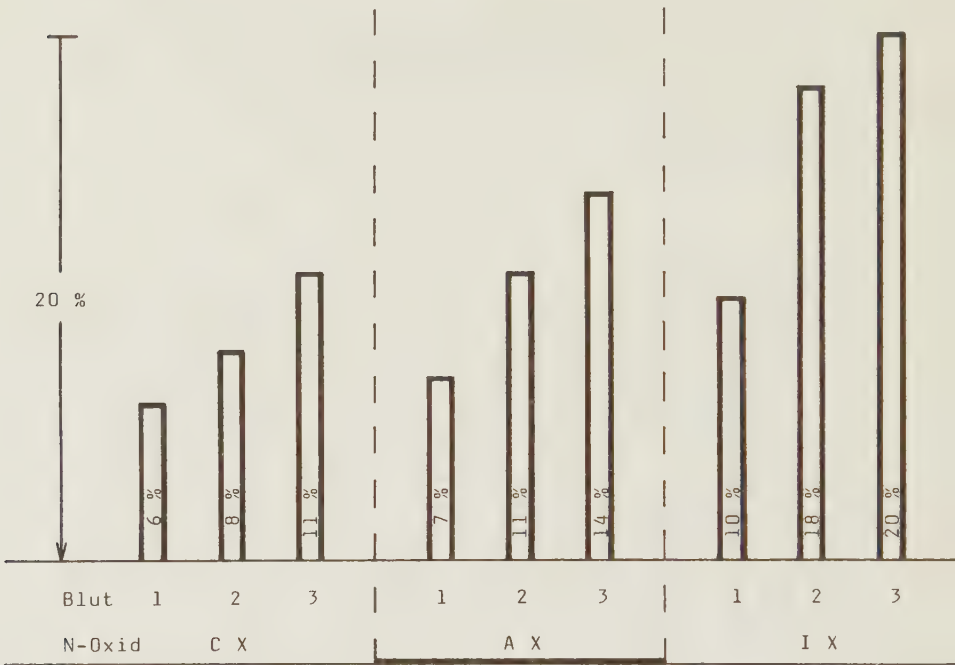


Abb. 16

Graphische Darstellung des Substanzanteils (N-Oxid + tertiäres Amin), der innerhalb der Erythrocyten gefunden wird, nach Inkubation von je 2,5 ml Vollblut dreier verschiedener Personen mit drei verschiedenen N-Oxiden (Ax, Ix, Cx).

(Innerhalb des Plasma wurde dann der auf 100 % fehlende Substanzanteil gefunden.)

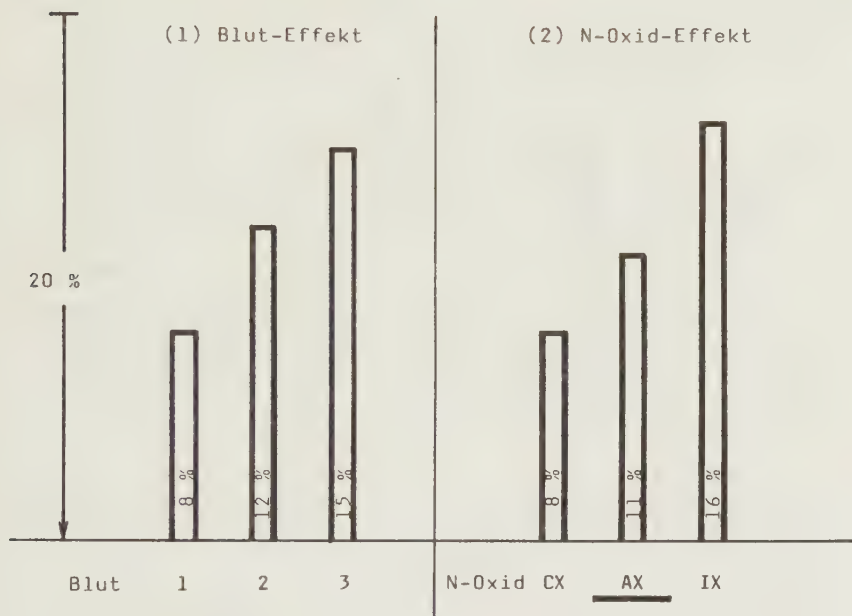


Abb. 17

Graphische Darstellung des Substanzanteils (N-Oxid + tertiäres Amin) der innerhalb der Erythrocyten gefunden wird, nach Inkubation von je 2,5 ml Vollblut dreier verschiedener Personen mit je 5.000 ng dreier verschiedener N-Oxide (Ax, Ix, Cx).

Um den Einfluß (1) des Blutes und (2) des N-Oxides auf die Substanzverteilung getrennt betrachten zu können, wurde hier

- (1) über die drei N-Oxid-Werte jedes Blutes und
- (2) über die drei Blut-Werte jedes N-Oxides gemittelt.

b) Anteil des tertiären Amins (Umsatz)

innerhalb der Erythrocyten.

(s. auch Abb. 18 sowie Anhang, Tabelle 55)

Gemittelt über die drei N-Oxide gilt :

Die Erythrocyten des Blutes 1 setzen am wenigsten, die des Blutes 3 am meisten des in ihnen befindlichen N-Oxids zum tertiären Amin um.

Gemittelt über die drei Probanden gilt :

Innerhalb der Erythrocyten wird Chlorimipramin-N-Oxid stärker, Imipramin-N-Oxid in weniger starkem Maße reduziert als Amitriptylin-N-Oxid.

c) Anteil des tertiären Amins in

Erythrocyten + Plasma (Gesamtumsatz).

(s. auch Abb. 19 sowie Anhang, Tab. 58)

Der Gesamtumsatz ist im wesentlichen abhängig von dem Anteil des N-Oxides, der aus dem Blut-Plasma in das Innere der Erythrocyten gelangt (s. a)) und weniger stark von dem Prozentsatz des N-Oxides, welcher dort zum tertiären Amin reduziert wird (s. b)).

Daher gilt:

Gemittelt über die drei N-Oxide setzt Blut 1 am wenigsten, Blut 3 am meisten N-Oxid zum tertiären Amin um.

Gemittelt über die drei Probanden wird Chlorimipramin-N-Oxid weniger stark, Imipramin-N-Oxid aber in stärkerem Maße reduziert als Amitriptylin-N-Oxid.

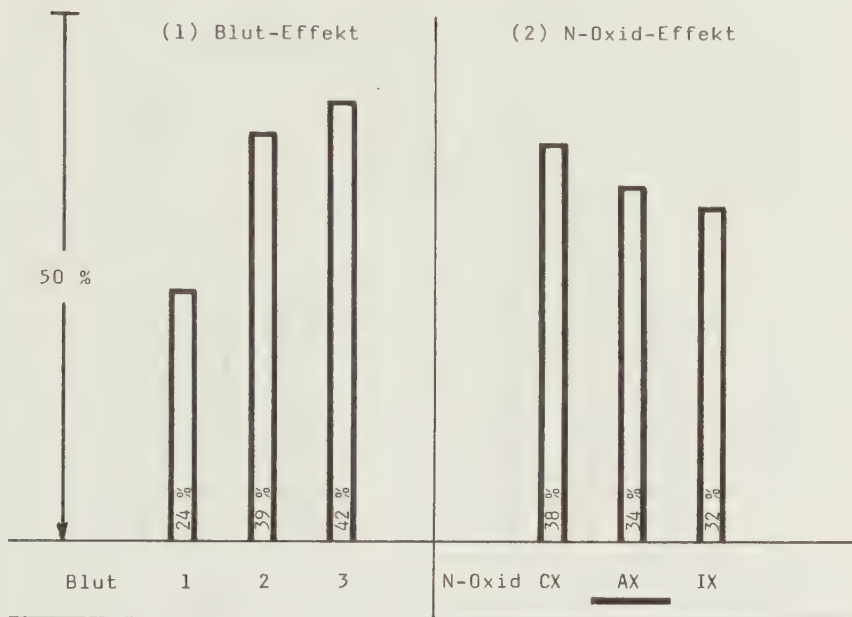


Abb. 18

Graphische Darstellung des innerhalb der Erythrocyten als tertiäres Amin (At, Im, Cl) meßbaren Pharmakons (tertiäres Amin + N-Oxid in Erythrocyten = 100 %) nach Inkubationen von je 2,5 ml Vollblut dreier verschiedener Probanden mit je 5.000 ng N-Oxid (Ax bzw. Ix bzw. Cx).

Um den Einfluß (1) des Blutes und (2) des N-Oxids auf den Anteil des tertiärenamins in der Erythrocyten-Fraktion getrennt betrachten zu können, wurde

- (1) über die drei N-Oxid-Werte jedes Blutes und
- (2) bei jedem N-Oxid über die drei Probanden gemittelt.

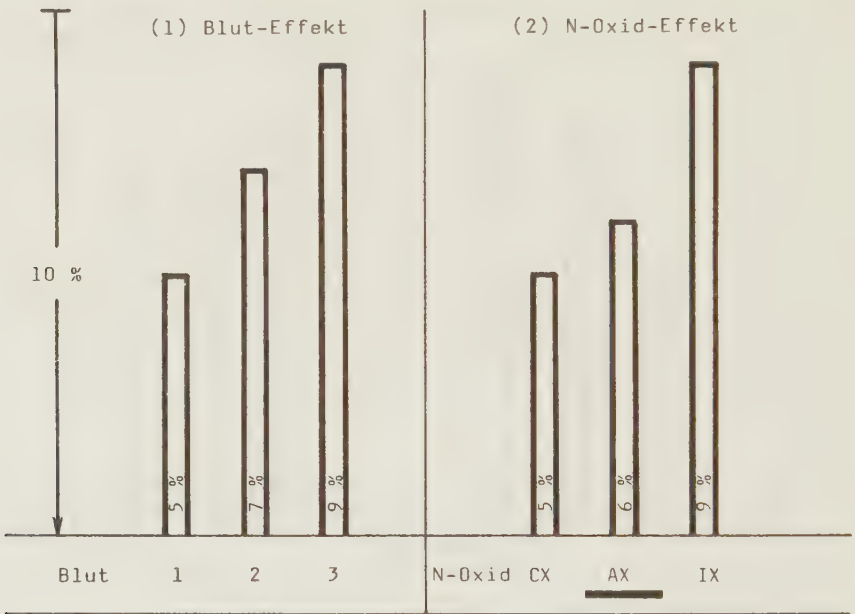


Abb. 19

Graphische Darstellung des im gesamten Vollblut als tertiäres Amin (At, Im, Cl) meßbaren Pharmakons (tertiäres Amin + N-Oxid in Erythrocyten + Plasma = 100 %) nach Inkubationen von je 2,5 ml Vollblut dreier verschiedener Probanden mit je 5.000 ng N-Oxid (Ax bzw. Ix bzw. Cx).

Um den Einfluß (1) des Blutes und (2) des N-Oxids getrennt betrachten zu können, wurde

- (1) über die drei N-Oxid-Werte jedes Blutes und
- (2) bei jedem N-Oxid über die drei Probanden gemittelt.

d) Anteil des tertiären Amins im Plasma.

(s. auch Anhang, Tab. 55)

Im Plasma ist der Anteil des tertiären Amins stets sehr gering. Er beträgt (ohne ersichtliche Abhängigkeit vom Blut oder der Art des eingesetzten N-Oxides) zwischen 1 % und 6 % .

ZUSAMMENFASSUNG:

Auch innerhalb eines Experimentes lassen sich interindividuelle Unterschiede zwischen dem Blut verschiedener Personen feststellen, die für alle drei N-Oxide in gleicher Weise gelten.

Für die Unterschiede zwischen den untersuchten N-Oxiden gilt :

Der intraerythrocytäre Substanzanteil ist bei
 $CX < AX < IX$.

Innerhalb der roten Blutzellen wird
 $CX > AX > IX$ zum tertiären Amin reduziert.

Im Plasma wird kaum tertiären Amin gefunden.

13.) VERGLEICH :

Erythrocyten in Blut-Plasma -
Erythrocyten in Puffer .

Bei diesem Versuch wurden Erythrocyten einmal in Plasma (Vollblut) und einmal in PBS-Puffer (pH 7,4 , plasmaisoton) suspendiert, um zu sehen, wie sich die Plasmaproteine - die den wesentlichsten Unterschied zwischen Plasma und Puffer ausmachen - auf die Verteilung und die Reduktionsrate des Amitriptylin-N-Oxides auswirken.

VERSUCHSDURCHFÜHRUNG:

je 1,0 ml Vollblut bzw. Erythrocyten-in-Puffer-Suspension
je 200 ng und 2.000 ng Ax
je 5 Minuten und 60 Minuten bei 37 ° C inkubiert.

ERGEBNISSE:

Ergebnis-Tabellen mit Angabe der Nanogramm, der Prozentanteile für jedes Kompartiment einzeln sowie der Substanzverteilung und des Gesamtumsatzes,
s. Anhang, Tabellen 59 bis 63 .

Ergebnisse in Prozenten, für Erythrocyten und Plasma gemeinsam, s. Tabelle 17 .

Tabelle 17

Prozentualer Anteil des als At bzw. als Ax in Erythrocyten bzw. im Plasma meßbaren Pharmakons nach Inkubationen von je 0,5 ml Erythrocyten, die z. T. in 0,5 ml Plasma und z. T. in 0,5 ml PBS-Puffer (plasmaisoton, pH 7,4) suspendiert waren mit 200 ng bzw. 2.000 ng Ax.

Inkubationszeiten: 5 Minuten und 60 Minuten.

(At + Ax in Erythrocyten + Plasma = 100 %)

		Erys in Plasma	Erys in Puffer
Erys	At :	18	45
	Ax :	1	4
Medium (Plasma/ Puffer)	At :	13	2
	Ax :	68	49

Die Werte für die beiden Ax-Mengen und die beiden Inkubationszeiten wurden gemittelt, da sich kaum Unterschiede ergaben.

a) Substanzverteilung

(s. auch Abb. 20 und Anhang, Tab. 62)

Während bei der Vollblut-Inkubation nur ca. 20 % des eingesetzten Amitriptylin-N-Oxids in die Erythrocyten hinein diffundieren und die restlichen 80 % im Plasma verbleiben, gehen bei den Erythrocyten-in-Puffer-Inkubationen etwa die Hälfte des Pharmakons (durchschnittlich 49 %) in die roten Blutzellen hinein.

Amitriptylin-N-Oxid wird also von Blut-Plasma (Proteinbindung) erheblich stärker gebunden als von PBS-Puffer. Daß im Puffer aber noch die Hälfte des Pharmakons zurückbleibt, spricht gegen eine Bindung der Substanzen an die Proteine des Erythrocyten-Inneren (v. a. Hämoglobin).

b) Umsatz (Amitriptylin-Anteil)

(s. auch Abb. 20 und Anhang, Tabellen 60 und 63)

Innerhalb der Erythrocyten wird mehr als 90 % des N-Oxids zu Amitriptylin reduziert, unabhängig davon, ob die Erythrocyten in Plasma oder PBS-Puffer suspendiert sind.

Bedingt durch die unterschiedliche Substanzverteilung ist daher der Gesamtumsatz (At in Erythrocyten + Medium) bei der Erythrocyten-in-Puffer-Suspension höher (ca. 47 %) als bei der Vollblut-Inkubation (ca. 31 %).

Daß die Differenz kleiner ist als bei der Substanzverteilung liegt daran, daß sich im Plasma mehr tertiäres Amin befindet (ca. 18 %) als im Puffer (ca. 4 %).

Der Amitriptylin-Anteil im Plasma ist bei Experiment 13.) zwar höher (14 % - 24 %) als in den meisten anderen, aber verglichen mit demjenigen innerhalb der Erythrocyten (> 90 %) noch immer recht gering.

Weitere Versuche mit Erythrocyten in Puffer

Inkubationen mit Suspensionen von Erythrocyten in PBS-Puffer (ähnlich dem eben dargestellten) wurden auch noch innerhalb einiger weiterer Experimente gemacht.

Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tab. 18 zusammengestellt (entsprechend der zusammenfassenden Darstellung verschiedener Vollblut-Experimente in Tab. 15

Dabei ergibt sich folgendes, durchschnittliche Bild:

a) Substanzverteilung (s. auch Tab. 18 und Abb. 20)

Auch im Durchschnitt beträgt der Gesamtsubstanz-Anteil, der innerhalb der Erythrocyten gefunden wurde 50 %.

Rote Blutzellen, die in Puffer suspendiert sind, nehmen also die Hälfte des darin enthaltenen Amitriptylin-N-Oxids auf, wenn die Suspension einem Hämatokrit-Wert von 50 % entspricht. Das heißt, gleiche Volumina Puffer und Erythrocyten-Inhalt enthalten gleiche Mengen Pharmakon.

Das spricht gegen eine Bindung der Substanzen an das Hämoglobin oder andere Proteine des Erythrocyten-Cytoplasmas, denn im Puffer stehen auch keine Bindungs-Proteine zur Verfügung.

Man könnte nun vermuten, daß eine Bindung der Pharmaka an das Hämoglobin stattfindet, die so stark ist, daß sie die Extraktion von Ax und At behindert und damit einen niedrigeren intraerythrocytären Substanzanteil vortäuscht, als er tatsächlich vorliegt.

Dann müsste jedoch die Extraktionsausbeute einer Erythrocyten-in-Puffer-Suspension erheblich geringer sein, als diejenige eines Vollblutes vom gleichen Probanden.

Tabelle 19 zeigt, daß die Extraktionsausbeute von Vollblut-Versuchen zwar etwas höher ist, als die entsprechenden Erythrocyten-in-Puffer-Inkubationen; die Differenz ist aber recht gering. (Bei Vernachlässigung von Versuch 15.), der hier einen "Ausreißer" darstellt.) :

Die Extraktionsausbeuten unterscheiden sich um einen Faktor von etwa 1,1.

Bei Suspensionen von roten Blutzellen in isotonischem Puffer dürften im Mittel also etwas mehr als 50 % (bis ca. 60 %) der zugegebenen Pharmaka von den Erythrocyten aufgenommen werden.

Diese Unterschiede liegen aber noch im Bereich der inter-individuellen Variabilität und sind schwer exakt zu erfassen. Daher erscheint es in dieser Arbeit weiterhin angebracht, von den tatsächlich messbaren Pharmakomengen auszugehen, zumal es in erster Linie auf die Veränderungen von Verteilung und Umsatz des Ax ankommt und weniger auf die absoluten Werte.

Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse von fünf Experimenten bei denen Ax mit Suspensionen von 0,5 ml Erythrocyten in 0,5 ml PBS-Puffer (plasmaisoton, pH 7,4) inkubiert worden war. Angegeben sind die meßbaren prozentualen Anteile von At bzw. Ax in den Erythrocyten bzw. im Puffer (Einzelheiten s. die obere Reihe der Tabelle).

Nr.	(1) Prozent-Anteile von At bzw. Ax Erys : At + Ax = 100% Puffer: At + Ax = 100%				(2) Prozent-Anteile von At bzw. Ax (At + Ax) in den Erys + (At + Ax) im Puffer = 100 %				(3) Verteilung von (At + Ax)		(4) At bzw. Ax in Erys + Puffer (Gesamtumsatz)		Versuchsbedingungen		vgl.	
	ERYS		PUFFER		ERYS		PUFFER		E	Pf	At	Ax	ml Hämolyse	mg Ax		
	At	Ax	At	Ax	At	Ax	At	Ax								
1	91	9	4	96	45	4	2	49	49	51	47	53	1,0	200 2000	5 60	13.)
2	51	49	12	88	17	17	8	58	34	66	25	75	1,0	2000	60	14.)
3	59	41	8	92	37	26	3	34	63	37	40	60	1,0	5000	60	15.)
4	39	61	12	88	18	28	6	48	46	54	24	76	1,0	2000	20	18.)
5	59	41	12	88	32	27	5	36	59	41	37	63	1,0	2000	100	----
DURCH-SCHNITT:	60	40	10	90	30	20	5	45	50	50	35	65				

Die Experimente wurden an verschiedenen Tagen unter verschiedenen Fragestellungen durchgeführt. Daher sind die Versuchsbedingungen uneinheitlich und in der entsprechenden Spalte der Tabelle angegeben. Sind die Werte Versuchen entnommen, die an anderer Stelle in dieser Arbeit genauer beschrieben werden, so ist deren Nummer in der letzten Spalte (unter "vgl.") genannt.

Tabelle 19

Vergleichende Zusammenstellung von fünf Versuchen, bei denen Inkubationen sowohl von Vollblut als auch von Erythrocyten-Puffer-Suspensionen (je 0,5 ml Erythrocyten + 0,5 ml Plasma bzw. PBS-Puffer - plasmatisotone, pH 7,4) mit Ax vorgenommen wurden.

Angegeben ist jeweils der prozentuale Anteil des Pharmakons, der aus dem Medium (Plasma/Puffer) in die Erythrocyten aufgenommen wurde, sowie die Extraktionsausbeute des betreffenden Versuchs.

$$\text{Extraktionsausbeute} = \frac{At + Ax}{\text{dem Inkubationsansatz zugegebenes Ax}} \text{ in Erys + Medium}$$

Des weiteren wurde das "Verhältnis der Extraktionsausbeuten"

$$\text{berechnet : } \frac{\text{Extraktionsausbeute bei "Vollblut"}}{\text{Extraktionsausbeute bei "Erys in Puffer"}}$$

Nr.	Substanzanteil innerhalb der Erythrocyten		Extraktions-Ausbeute		Verhältnis der Extraktionsausbeuten	vgl.
	Vollblut	Erys in Puffer	Vollblut	Erys in Puffer		
1	19	49	55	50	1,1	13.)
2	12	34	58	50	1,2	14.)
3	20	63	82	24	---	15.)
4	21	46	44	44	1,0	18.)
5	23	59	54	44	1,2	----
Mittelwert:					1.1	

Bei der Berechnung des Mittelwertes von "Verhältnis der Extraktionsausbeuten" blieb der Wert des 3. Versuchs unberücksichtigt, da dieser einen "Ausreißer" darstellt.

Bei den in dieser Tab. genannten Versuchen handelt es sich um die gleichen, die in Tab. 18 zusammengestellt sind; und die korrespondierenden Vollblut-Experimente erscheinen auch in Tab. 15. Daher gilt auch hier, daß die Experimente an verschiedenen Tagen unter verschiedenen Fragestellungen durchgeführt wurden und die Versuchsbedingungen uneinheitlich sind. Dennoch wurde hier - aus Gründen der Übersichtlichkeit - auf die genaue Angabe der Versuchsbedingungen verzichtet (Diese können aber den Tabellen 15 und 18 entnommen werden).

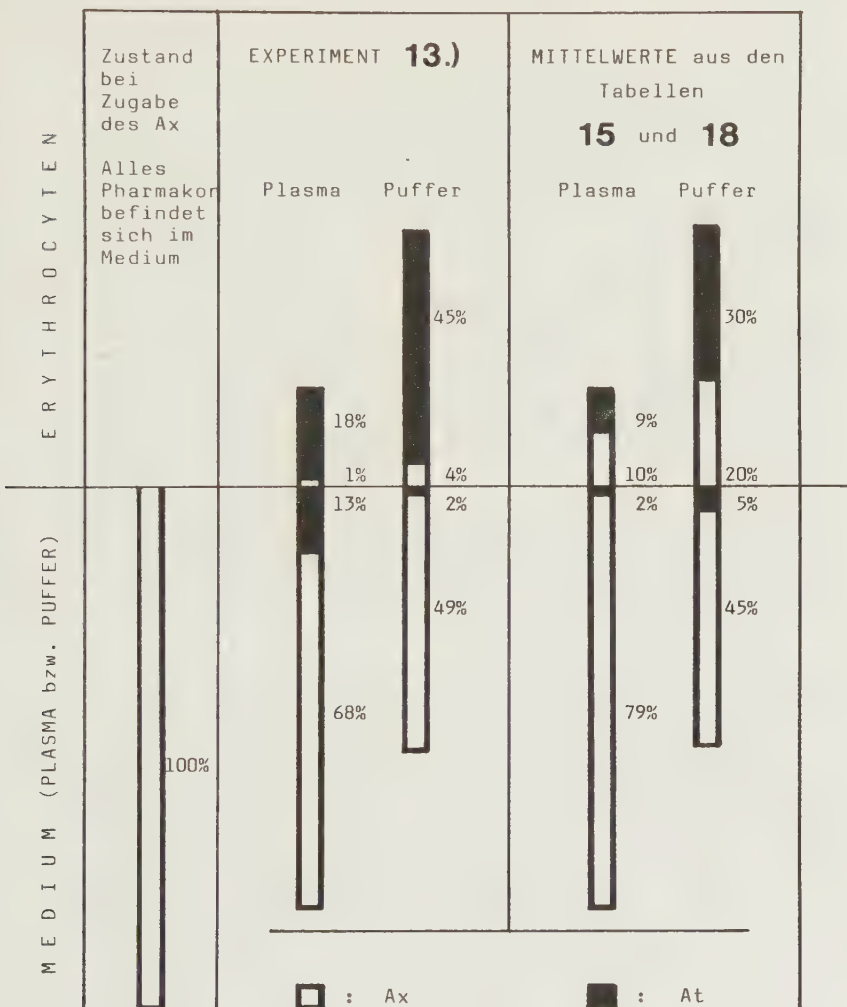


Abb. 20 . Graphische Darstellung der Verteilung der Gesamtsubstanz (At + Ax) zwischen Erythrocyten und dem Medium sowie des At-Anteils innerhalb der beiden Kompartimente nach Inkubationen von Vollblut bzw.

Erythrocyten - Puffer - Suspension (je 0,5 ml Erythrocyten + 0,5 ml Plasma bzw. PBS-Puffer) mit Ax. (PBS-Puffer: plasmaisoton, pH 7,4)

Dargestellt sind die Ergebnisse von Versuch 13.) (vgl. Tab. 17) sowie die Mittelwerte aus fünf ähnlichen Versuchen, die den Tabellen 15 bzw. 18 entnommen sind.

b) Umsatz (Amitriptylin-Anteil)

Innerhalb der Erythrocyten werden 40 % bis 90 % des dort befindlichen N-Oxids zu Amitriptylin reduziert (im Mittel 60 %).

Im Puffer liegen durchschnittlich 10 % (4 % bis 12 %) des Pharmakons in der reduzierten Form vor.

Dieser, im Vergleich zu den Vollblut-Inkubationen relativ hohe Anteil dürfte auf eine stärkere Hämolyse in diesem weniger physiologischen Medium zurückzuführen sein.

Die Ergebnisse von Experiment 13.) entsprechen bezüglich der Substanzverteilung weitgehend dem Mittel (Tab. 18), der Umsatz ist jedoch weit überdurchschnittlich.

ZUSAMMENFASSUNG:

In Vollblut werden etwa 20 % der Gesamtsubstanz innerhalb der Erythrocyten wiedergefunden, bei Ersatz des Plasmas durch isotonischen Puffer steigt dieser Anteil auf 50 %. Innerhalb der roten Blutzellen wird dabei ein recht konstanter (aber interindividuell verschiedener) Prozentsatz des N-Oxids zum tertiären Amin reduziert, unabhängig davon, in welchem Medium die Erythrocyten suspendiert sind. Daher nimmt die im gesamten Ansatz gebildete Amitriptylin-Menge mit steigendem intraerythrocytären Substanzanteil zu.

14.) Stufenweise Verdünnung des Plasmas
mit PBS-Puffer und H_2O und
Verdünnung von PBS-Puffer mit H_2O .

Wie das vorige Experiment gezeigt hat, nehmen Erythrocyten, die in PBS-Puffer suspendiert sind einen erheblich höheren Anteil des zugesetzten Ax auf als solche, die sich in Blut-Plasma befinden.

Um diesen Effekt genauer zu untersuchen, wurde im folgenden Versuch das Plasma eines Vollblutes (Hämatokritwert: 50 %) s c h r i t t w e i s e durch PBS-Puffer ersetzt. Das Verhältnis der Volumina von Erythrocyten und Medium blieb dabei konstant 1 : 1 .

Außerdem erfolgte eine entsprechend durchgeführte Verdünnung von Plasma bzw. PBS-Puffer mit $H_2O_{bidest.}$ (Jedoch nur bis zu einem Anteil von 40 % Wasser, da eine weitere Verdünnung zu einer osmotischen Hämolyse der roten Blutzellen geführt hätte.) Die dadurch verminderte Osmolarität des Mediums bewirkt eine Quellung der Erythrocyten (durch Wassereinstrom) , die dann statt ihrer üblichen Scheibchenform eine kugelige Gestalt annehmen.

Geprüft werden sollte mit diesem Experiment, wie sich

- a) eine Herabsetzung der Plasmaprotein-Konzentration ,
 - b) eine Verminderung der Plasma-Osmolarität und
 - c) beides zusammen
- auf Verteilung und Reduktion von Amitriptylin-N-Oxid auswirkt.

Jeder Wert wurde doppelt bestimmt

VERSUCHSDURCHFÜHRUNG:

je 0,5 ml Erythrocyten + 0,5 ml Medium

je 2.000 ng Ax , 60 Minuten bei 37 ° C inkubiert.

Herstellung folgender Medien:

Plasma / PBS-Puffer : 5 / 0 , 4 / 1 , 3 / 2 , 0 / 5

PBS-Puffer / H₂O : 5 / 0 , 4 / 1 , 3 / 2

Plasma / H₂O : 5 / 0 , 4 / 1 , 3 / 2

ERGEBNISSE:

Ergebnis-Tabellen mit Angabe der Nanogramm, der Prozentanteile für jedes Kompartiment einzeln sowie der Substanzverteilung und des Gesamtumsatzes,

s. Anhang, Tabellen 64 bis 68 .

Ergebnisse in Prozenten, für Erythrocyten und Plasma gemeinsam, s. Tabelle 20 .

Tabelle 20

Prozentualer Anteil des als At bzw. als Ax in den Erythrocyten bzw. im umgebenden Medium meßbaren Pharmakons nach Inkubationen von je 2.000 ng Ax mit Suspensionen von 0,5 ml Erythrocyten in 0,5 ml Medium. Dieses Medium setzte sich

- entsprechend den in der oberen Reihe der Tabelle genannten Prozentanteilen
- aus den Bestandteilen Plasma, PBS-Puffer (plasmaisoton, pH 7,4) und Wasser zusammen.

(At + Ax in Erythrocyten + Medium = 100 %)

Plasma (%):		100	80	60	0	0	0	80	60
Puffer (%):		0	20	40	100	80	60	0	0
Wasser (%):		0	0	0	0	20	40	20	40
ERYS	At	8	11	14	17	27	27	8	9
	Ax	3	4	5	17	18	16	4	3
MEDIUM	At	1	1	1	8	8	8	2	2
	Ax	88	84	80	58	47	49	86	86

Das die Erythrocyten umgebende Medium ist zunächst (ganz links) reines Plasma. Dieses wird dann schrittweise durch PBS-Puffer ersetzt, bis das Medium 100 % Puffer ist. Dieser wird dann weiter mit Wasser verdünnt (wegen beginnender osmotischer Hämolyse nur bis zu einem Wasseranteil von 40 %). Die letzten beiden Spalten der Tabelle zeigen eine Verdünnung von Plasma mit Wasser.

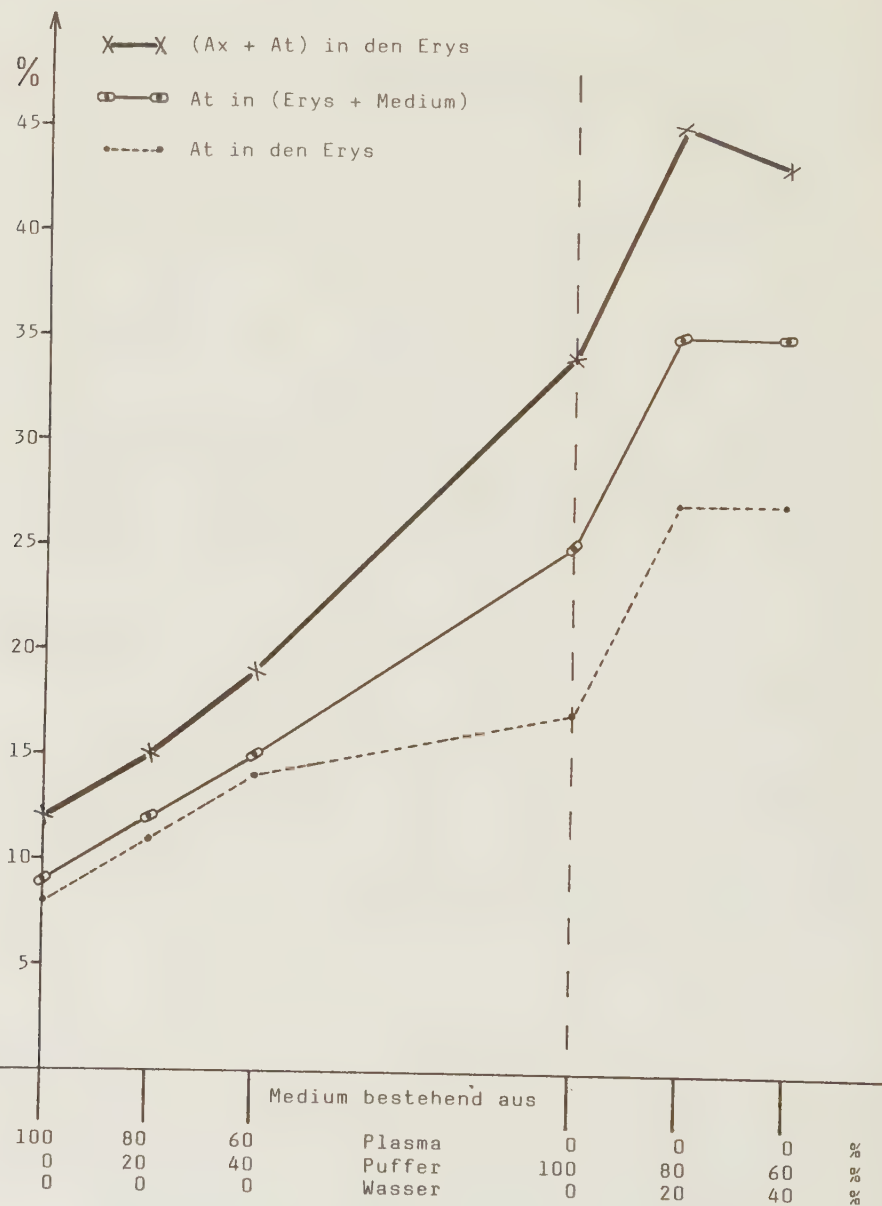


Abb. 21 (nebenstehend)

Graphische Darstellung

- des innerhalb der Erythrocyten gefundenen Pharmakonanteils (At + Ax) : $X \longleftrightarrow X$
- des im gesamten Inkubationsansatz (Erythrocyten + Medium) meßbaren At : $\bullet \longleftrightarrow \bullet$
- des innerhalb der Erythrocyten als At meßbaren Pharmakons : $\bullet \cdots \cdots \bullet$

nach Inkubationen von je 2.000 ng Ax mit einer Suspension von 0,5 ml Erythrocyten in 0,5 ml Medium.

Dieses Medium war - entsprechend den auf der Abszisse angegebenen Prozentanteilen - aus den Bestandteilen P l a s m a , P B S - P u f f e r (plasmaisoton, pH 7,4) und W a s s e r ($H_2O_{bidest.}$) zusammengesetzt.

Für die Berechnung der Ergebnisse gilt:

$$\frac{\text{At} + \text{Ax}}{\text{in Erythrocyten} + \text{Medium}} = 100 \%$$

Die Differenz zwischen der mittleren ($\bullet \longleftrightarrow \bullet$) und der unteren ($\bullet \cdots \cdots \bullet$) Kurve ist ein Maß für das im Medium befindliche At.

a) Substanzverteilung

(s. auch Abb. 21 und Anhang, Tabelle 67)

Einfluß der Proteinkonzentration im Medium:

Mit zunehmender Verdünnung des die Erythrocyten umgebenden Plasmas mit PBS-Puffer steigt der Anteil des zugegebenen Ax, der von den roten Blutzellen aufgenommen wird, von 12 % (reines Plasma) auf 34 % (reiner Puffer) an.

Einfluß der Elektrolytkonzentration im Medium:

Bei Verdünnung der PBS-Puffers mit H_2O verschiebt sich die Verteilung des Ax zwischen Erythrocyten und Medium weiter zu Gunsten der Erythrocyten. (Von 35 % bei reinem Puffer auf 45 % bei einem H_2O -Anteil von 20 %.)

(Der bei einem H_2O -Anteil von 40% auftretende geringe Abfall dieses Wertes dürfte auf eine beginnende osmotische Hämolyse zurückzuführen sein.)

Wird Plasma anstatt mit PBS-Puffer mit $H_2O_{bidest.}$ verdünnt, resultiert demgegenüber praktisch keine Änderung der Ax-Verteilung.

b) Umsatz

(s. auch Abb. 21 und Anhang, Tabellen 65 und 68)

Umsatz innerhalb der Erythrocyten

Verdünnung des Plasmas mit PBS-Puffer führt bei Experiment 14.) innerhalb der Erythrocyten zu einer Abnahme des Amitriptylin-Anteils (von 76 % auf 51 %), Verdünnung des Puffers mit H₂O wieder zu einem Anstieg (auf 62 %). Dies ist jedoch kein regelmäßiger Befund.

Amitriptylin-Anteil im Medium

In Medien, die Plasma enthalten, liegen 1 % bis 2 % des Pharmakons als Amitriptylin vor, bei den plasmafreien Medien dagegen 12 % bis 14 %.

Dies dürfte auf eine stärkere Hämolyse im unphysiologischen Milieu zurückzuführen sein (Erythrocyten-protektive Wirkung des Plasmas oder eines seiner Bestandteile).

Gesamtumsatz

Der Gesamtumsatz hängt in erster Linie von der Substanzverteilung ab und verhält sich daher ebenso wie diese: Bei Verdünnung von Plasma mit Puffer nimmt er von 9 % (reines Plasma) auf 25 % (reiner Puffer) zu; bei Verdünnung von Puffer mit H₂O steigt er weiter bis auf 35 %.

(Für die Verdünnung von Plasma mit Wasser ergeben sich keine so eindeutigen Beziehungen.)

ZUSAMMENFASSUNG:

Bei Verminderung der Proteinkonzentration im Plasma wird von den Erythrocyten mehr Pharmakon aufgenommen. Verminderung der Elektrolytkonzentration im Puffer (proteinfrei) führt zu einer weiteren Zunahme des intraerythrocytären Substanzanteils.

15.) Verteilung der Gesamtsubstanz
sowie endogenen und exogenen
Amitriptylins in Vollblut und in
Erythrocyten-Plasma-Suspensionen.

In diesem Versuch wurde Vollblut (Hämatokrit-Wert: 50 %) und eine Suspension von Erythrocyten in PBS-Puffer (entsprechend einem Hk-Wert von 50 %) sowohl mit Ax, als auch mit At inkubiert, und es wurden stark unterschiedliche Inkubationszeiten gewählt.

Damit war beabsichtigt, die Verteilung des in den roten Blutzellen aus Ax gebildeten At zwischen Erythrocyten und Plasma (bzw. Puffer) , mit der Verteilung des gleichen Pharmakons zu vergleichen, wenn es dem Inkubationsansatz von außen zugeführt wird, und mit der Verteilung der Gesamtsubstanz (Ax + At) bei Ax-Inkubation. Der Zeitablauf dieser Verteilungsvorgänge sollte ebenfalls verfolgt werden.

VERSUCHSDURCHFÜHRUNG:

je 1 ml Vollblut bzw. 1 ml Erythrocyten-in-Puffer
Pharmakon-Mengen : 5.000 ng Ax bzw. 1.000 ng At
Inkubationszeiten : 2 Minuten (d.h. so kurz wie möglich)
 60 Minuten und
 22 Stunden
Temperatur : 37 ° C .
je 1 Ansatz.

ERGEBNISSE:

Ergebnis-Tabellen mit Angabe der Nanogramm, der Prozentanteile für jedes Kompartiment einzeln sowie der Substanzverteilung und des Gesamtumsatzes,
s. Anhang, Tabellen 59 bis 74 .

Ergebnisse in Prozenten, für Erythrocyten und Plasma gemeinsam, s. Tabelle 21 .

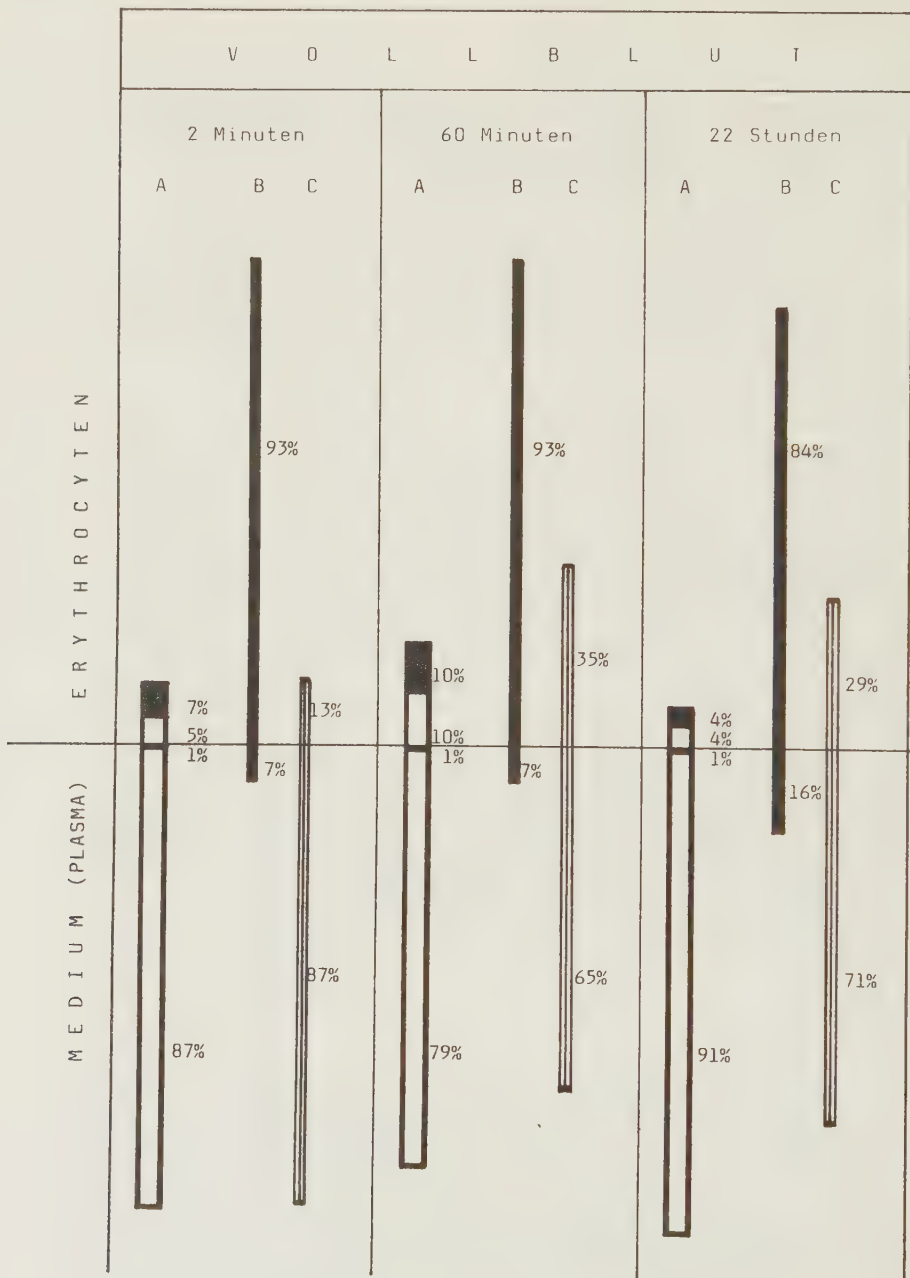
Tabelle 21

Prozentualer Anteil des als At bzw. als Ax in den Erythrocyten bzw. im Medium (Plasma/PBS-Puffer) meßbaren Pharmakons nach Inkubationen von 5.000 ng Ax mit Suspensionen von 0,5 ml Erythrocyten in 0,5 ml Plasma bzw. PBS-Puffer (plasmaisoton, pH, 7,4) und

prozentualer Anteil des innerhalb der Erythrocyten bzw. im Plasma meßbaren At nach Inkubationen von 1.000 ng At mit Suspensionen von 0,5 ml Erythrocyten in Plasma bzw. PBS-Puffer.

Jeweils drei Inkubationszeiten: 2 Minuten, 60 Minuten und 22 Stunden.

Inkubation von	Kompar- timent	Analyse	V O L L B L U T			Erys in Puffer		
			2 min	60 min	22 Std	2 min	60 min	22 Std
AX	Erys	At	7	10	4	35	37	26
		Ax	5	10	4	21	26	21
	Med.	At	1	1	1	1	3	5
		Ax	87	79	91	43	34	48
AT	Erys	At	13	35	29	73	85	69
	Med.	At	87	65	71	27	15	31



ERYTHROCYTEN IN PUFFER

2 Minuten

A B C

60 Minuten

A B C

22 Stunden

A B C

ERYTHROCYTEN

MEDIUM (PUFFER)

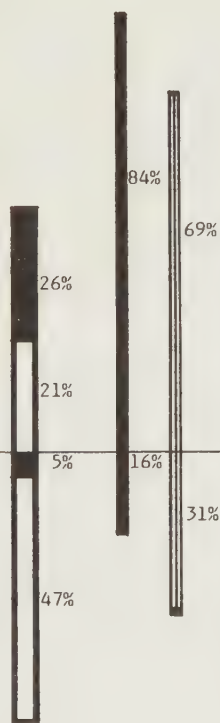
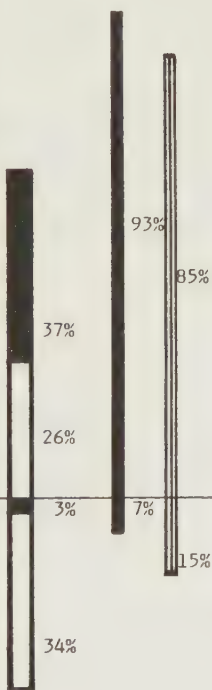
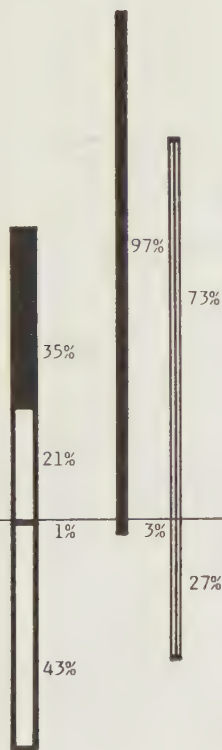


Abb. 22 (vorstehende Doppelseite)

Graphische Darstellung

- der Verteilung der Gesamtsubstanz (At + Ax) zwischen Erythrocyten und Medium (Plasma/Puffer) sowie
- des At-Anteils innerhalb dieser beiden Kompartimente dargestellt durch die breiten Säulen. (A)
Darin bedeutet  : Amitriptylin /  : Amitriptylin-N-Oxid
- der Verteilung des meßbaren At zwischen Erythrocyten und Medium (Plasma/Puffer)
dargestellt durch die schmalen schwarzen Säulen:  (B)
nach Inkubationen von je 5.000 ng Ax mit Suspensionen von 0,5 ml Erythrocyten in 0,5 ml Plasma bzw. PBS-Puffer (plasmaisoton, pH 7,4).
- der Verteilung des At zwischen Erythrocyten und Medium (Plasma/Puffer) nach Inkubationen von je 1.000 ng At mit Suspensionen von 0,5 ml Erythrocyten in 0,5 ml Plasma bzw. PBS-Puffer
dargestellt durch die schmalen schraffierten Säulen:  (C)
- des Zeitverlaufs aller dieser Verteilungen durch Darstellung jeweils dreier Werte - für die drei Inkubationszeiten 2 Minuten, 60 Minuten und 22 Stunden.

Die Gesamthöhe der Säulen symbolisiert immer 100 % :

- bei den breiten Säulen:
100 % Gesamtsubstanz (At + Ax in Erythrocyten + Medium)
- bei den schmalen Säulen:
100 % At (At in Erythrocyten + Medium) .

a) Substanzverteilung

(s. auch Abb. 22 und Anhang, Tabelle 73)

Im Vollblut befinden sich nach zwei Minuten 12 % der Gesamtsubstanz ($A_x + A_t$) innerhalb der Erythrocyten. Dieser Anteil steigt nach 60 Minuten auf 20 % und fällt nach 22 Stunden wieder bis auf 8 % ab. Die Inkubation der Erythrocyten in Puffer zeigt qualitativ den gleichen Zeitverlauf, die absoluten Prozentwerte liegen jedoch erheblich höher: nach 2 Minuten sind 56 %, nach 60 Minuten 63 % und nach 22 Stunden 47 % des Pharmakons in den roten Blutzellen.

b) Umsatz

(s. auch Abb. 22 und Anhang, Tabellen 70 und 72)

Hier wird bei der Erythrocyten-in-Puffer-Suspension innerhalb der roten Blutzellen ein etwas höherer Prozentsatz Amitriptylin-N-Oxid reduziert (durchschnittlich 59 %) als im Vollblut (durchschnittlich 52 %). In beiden Fällen nimmt dieser Anteil mit der Zeit leicht ab (!).

Der Gesamtumsatz ist bei Verwendung von Puffer als Medium (vor allem aufgrund der anderen Verteilung) wesentlich höher (im Mittel 36 %) als beim Vollblut (im Mittel 8 %). Der Gipfel ist in beiden Fällen der 60-Minuten-Wert.

Der Amitriptylin-Anteil im Medium ist stets sehr gering (meist ca. 1 %), nur im Puffer liegt er bei den längeren Inkubationszeiten etwas höher. (Stärkere Hämolyse im unphysiologischeren Medium.)

c) Verteilung von endogenem und exogenem Amitriptylin

(s. auch Abb. 22 und Anhang, Tabelle 74)

Das in den Erythrocyten aus Ax gebildete Amitriptylin befindet sich zu allen Zeiten zum weitaus Überwiegenden Teil innerhalb der roten Blutzellen. Das gilt sowohl für die Vollblut-Inkubation als auch für die Inkubation von in Puffer suspendierten Erythrocyten. (Der geringe Abfall bei 22 Stunden läßt sich nicht in vollem Umfang mit einer stärkeren Hämolyse bei längerer Inkubation erklären, da das Amitriptylin im Medium nicht so stark - beim Vollblut überhaupt nicht - zunimmt, wie das intraerythrocytäre Amitriptylin zurückgeht.)

Von außen zugegebenes Amitriptylin zeigt demgegenüber eine völlig andere Verteilung:

Es verbleibt - beim Vollblut - zum größten Teil im Plasma. Der Zeitverlauf entspricht qualitativ dem der Gesamtsubstanzverteilung. Bei der Erythrocyten-in-Puffer-Suspension ist das exogene Amitriptylin zwar überwiegend innerhalb der Erythrocyten lokalisiert, aber dieser Anteil ist immer deutlich geringer als beim endogenen Amitriptylin.

Der intraerythrocytäre Anteil des von außen zugegebenen Amitriptylins ist stets größer als jener der Gesamtsubstanz (Ax + daraus gebildetes At):

Amitriptylin wird von den Erythrocyten (Hämoglobin) also stärker gebunden als Amitriptylin-N-Oxid.

Es gilt demnach :

Der Anteil innerhalb der Erythrocyten ist bei

Gesamtsubstanz ($A_x + A_t$) < exogenes A_t << endogenes A_t

Im Vollblut gilt weiterhin :

Bei A_t -Zugabe : $A_{t_{\text{Plasma}}} > A_{t_{\text{Erythrocyten}}}$

Bei A_x -Zugabe : $A_{x_{\text{Plasma}}} << A_{x_{\text{Erythrocyten}}}$

ZUSAMMENFASSUNG:

Bei den Vollblut-Inkubationen ist der intraerythrocytäre Substanzanteil von exogen zugeführtem Amitriptylin mit ca. 30 % höher als derjenige des N-Oxids (d.h. der gemessenen Gesamtsubstanz: $A_x + A_t$) mit ca. 20 %, aber erheblich geringer als beim endogenen (aus dem N-Oxid) gebildeten Amitriptylin mit etwa 90 %.

Bei Suspension der Erythrocyten in Puffer geht stets ein erheblich größerer Substanzanteil an die roten Blutzellen hinein, qualitativ bleiben die Verteilungsunterschiede der Substanzen aber gleich.

Die Verteilungen werden schnell erreicht (innerhalb weniger Minuten) und bleiben über mindestens 22 Stunden recht konstant.

Im Medium ist kaum Amitriptylin nachweisbar.

16.) Temperatur- und Zeitabhängigkeit
des Pharmakoneinstroms in die
Erythrocyten bei
zwei verschiedenen N-Oxiden.

Aus Experiment 15.) ist ersichtlich, daß der Substanz-einstrom in die roten Blutzellen nach zwei Minuten noch nicht vollständig abgeschlossen ist.

Mit Versuch 16.) sollte nun geklärt werden, ob und in welchem Ausmaß dieser Diffusionsprozeß von der Temperatur abhängt (es war beabsichtigt, die Diffusion zu verlangsamen, um sie besser verfolgen zu können) und ob er von der Art des N-Oxides beeinflußt wird.

Dazu wurde Vollblut bei zwei verschiedenen Temperaturen und mit zwei verschiedenen N-Oxiden während zweier verschiedener Zeiten inkubiert.

VERSUCHSDURCHFÜHRUNG:

je 1 ml Vollblut (Hämatokrit-Wert: 50 %)

je 2.000 ng Amitriptylin-N-Oxid bzw.

2.000 ng Imipramin-N-Oxid

Inkubationstemperaturen: 37°C bzw. 0°C (Eisbad)

Inkubationszeiten: 3 Minuten (Doppelbestimmung) und
90 Minuten (Einfachbestimmung)

ERGEBNISSE:

Ergebnis-Tabellen mit Angabe der Nanogramm, der Prozent-anteile für jedes Kompartiment einzeln sowie der Substanz-verteilung und des Gesamtumsatzes,
s. Anhang, Tabellen 75 bis 79.

Ergebnisse in Prozenten, für Erythrocyten und Plasma
gemeinsam, s. Tabelle 22 .

Tabelle 22

Prozentualer Anteil des als tertiäres Amin (At, Im) bzw. als N-Oxid (Ax, Ix) in den Erythrocyten bzw. im Plasma meßbaren Pharmakons nach Inkubationen von je 2.000 ng Ax bzw. Ix mit 1,0 ml Vollblut bei zwei verschiedenen Inkubationstemperaturen: 37°C und 0°C (Eisbad).

Zwei Inkubationszeiten: 3 Minuten und 90 Minuten.

Einsatz	Kompartiment	Analyse	0 ° C		37 ° C	
			3 min.	90 min.	3 min.	90 min.
A X	Erys	At	4	7	7	11
		Ax	1	7	6	4
	Plasma	At	2	1	1	2
		Ax	93	85	86	83
I X	Erys	Im	4	7	14	10
		Ix	1	5	10	10
	Plasma	Im	2	2	1	1
		Ix	93	86	75	79

Zur Veranschaulichung der Ergebnisse, s. Abb. 23.

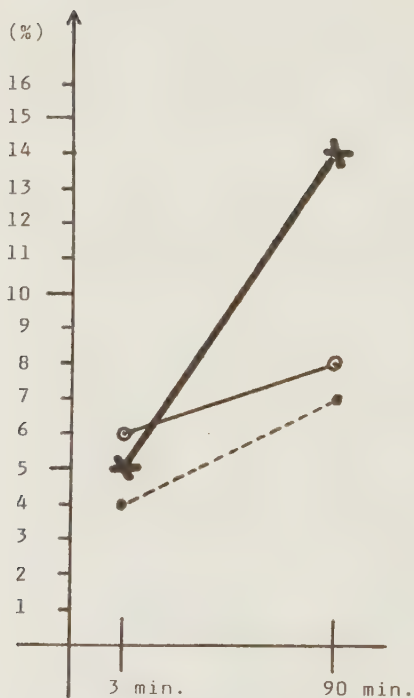
Inkubation von Vollblut mit 2.000 ng

A M I T R I P T Y L I N - N - O X I D

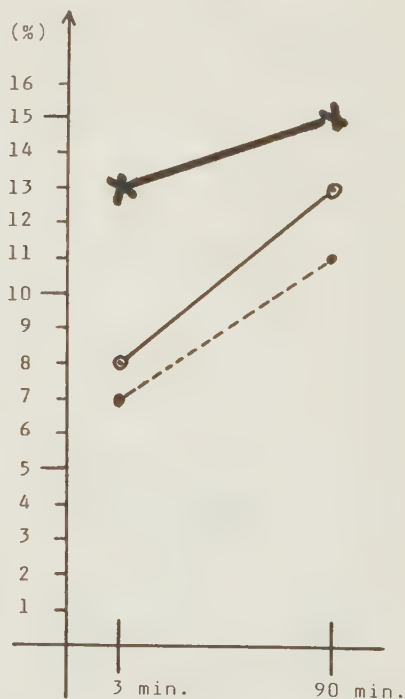
✕—✕ : Gesamtsubstanz-Anteil innerhalb der Erythrocyten

○—○ : Gesamtumsatz (Amitriptylin in Erys + Plasma)

●- - -● : Amitriptylin-Anteil in den Erythrocyten



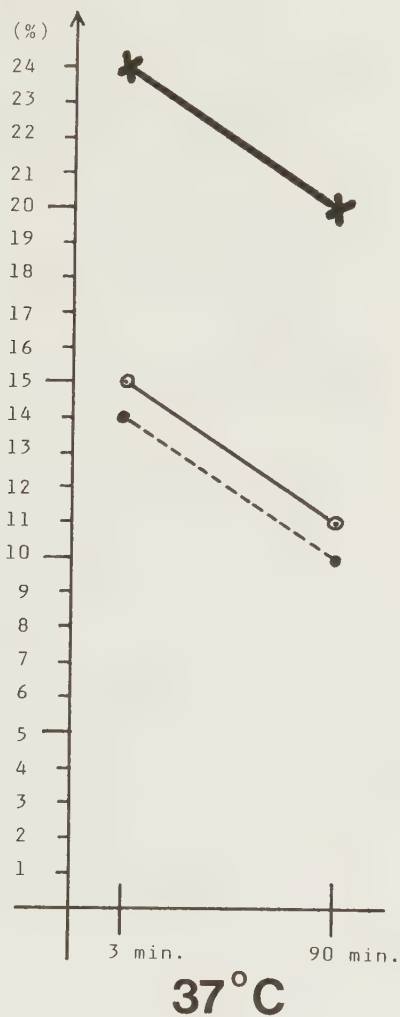
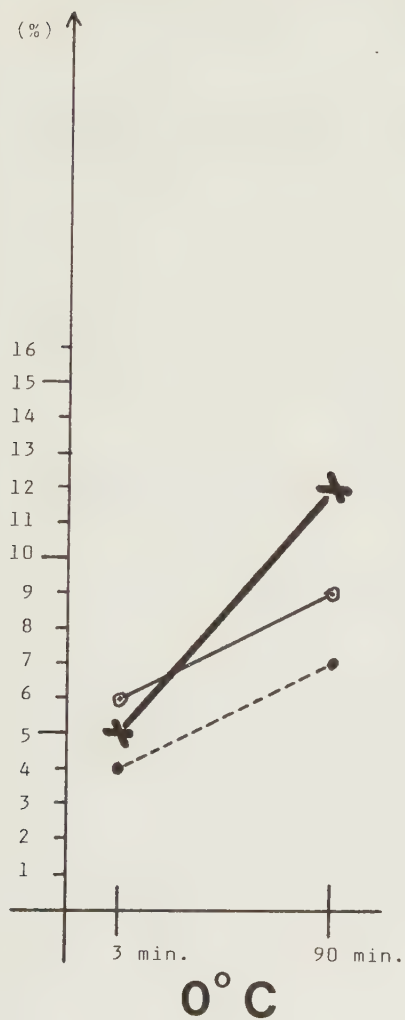
0°C



37°C

Inkubation von Vollblut mit 2.000 ng

IMIPRAMIN - N - O X I D



Legende, siehe folgende Seite

Abb. 23 (vorstehende Doppelseite)

Graphische Darstellung

- des innerhalb der Erythrocyten gefundenen Gesamtsubstanz-Anteils ($> At + Ax <$ bzw. $> Im + Ix <$) : 
- des im gesamten Inkubationsansatz (Erythrocyten + Plasma) meßbaren At bzw. Im : 
- des innerhalb der Erythrocyten als At bzw. als Im meßbaren Pharmakons : 

nach Inkubationen von 1,0 ml Vollblut (HK-Wert 50 %) mit je 2.000 ng Ax bzw. Ix bei zwei verschiedenen Inkubationstemperaturen. 37°C und 0°C (Eisbad).

- der Veränderungen dieser Parameter mit der Zeit, durch Angabe zweier Werte: für die beiden Inkubationszeiten 3 Minuten und 90 Minuten.

Für die Berechnung dieser prozentualen Ergebnisse gilt jeweils:

$$At + Ax \quad \text{in} \quad \text{Erythrocyten} + \text{Plasma} \quad = \quad 100 \%$$

(Die beiden - nach den unterschiedlichen Inkubationszeiten gemessenen - Werte eines N-Oxides bei einer Temperatur sind zur Veranschaulichung der Veränderung mit der Zeit durch eine Gerade verbunden. Diese soll jedoch keinen linearen Zusammenhang andeuten.)

(1.) Inkubationen bei 0°C .

(s. auch Abb. 23 und Anhang, Tabellen 75 bis 79)

Die Werte und Diagramme für Amitriptylin-N-Oxid und Imipramin-N-Oxid sind bei einer Inkubations-Temperatur von 0 ° C sehr ähnlich.

a) Substanzverteilung

Bei beiden N-Oxiden steigt der Pharmakon-Anteil innerhalb der Erythrocyten zwischen drei Minuten und 90 Minuten stark an :

Bei Ax von 5 % auf 14 %, bei Ix von 5 % auf 12 %.

b) Umsatz

Gesamtumsatz und intraerythrocytäres tertiäres Amin nehmen dagegen weniger stark zu.

Das im Plasma befindliche tertiäre Amin - und damit die Differenz zwischen diesen beiden Kurven - ist recht konstant (1 % - 2 % der Gesamtsubstanz).

Dies bedeutet, daß nach drei Minuten, wenn sich noch relativ wenig Pharmakon in den Erythrocyten befindet, dieses zu einem höheren Prozentsatz in reduzierter Form (tertiäres Amin) vorliegt, als nach 90 Minuten:

Bei Ax : 78 % gegenüber 50 % ;

Bei Ix : 75 % gegenüber 56 %

In der Abb. 23 kommt dies durch das Auseinanderstreben der Verteilungs- bzw. Umsatzkurven zum Ausdruck.

(2.) Inkubationen bei 37°C .

(s. auch Abb. 23 und Anhang, Tabellen 75 bis 79)

a) Substanzverteilung

Beim Ax nimmt der intraerythrocytäre Pharmakon-Anteil mit der Zeit noch etwas zu, jedoch wesentlich weniger stark als bei 0 ° C :
von 13 % auf 15 %.

Beim Imipramin-N-Oxid ist dagegen ein leichter Rückgang zu verzeichnen :
von 24 % auf 20 % .

Das heißt:

Bei einer Inkubations-Temperatur von 37 °C ist nach einer Inkubationszeit von drei Minuten der Pharmakontransport in die Erythrocyten praktisch abgeschlossen. Bei 0 ° C war das nicht der Fall.

b) Umsatz

Die beiden Umsatzkurven (sowohl bei Ax als auch bei Ix) folgen der Verteilungskurve, das heißt:
der prozentuale Umsatz innerhalb der Erythrocyten ändert sich hier kaum mit der Zeit (zumindest weniger als bei der 0°C-Inkubation; im Gegensatz zu dieser ist eher eine Steigerung zu verzeichnen).

Auch hier beträgt der Amitriptylin-Anteil im Plasma recht konstant 1 % bis 2 % .

ZUSAMMENFASSUNG:

Bei einer Temperatur von 37°C ist die Aufnahme der N-Oxide Amitriptylin-N-Oxid und Imipramin-N-Oxid aus dem Plasma in die Erythrocyten nach drei Minuten weitgehend abgeschlossen, bei einer Temperatur von 0°C dagegen noch nicht.

III

• EXPERIMENTE MIT PHARMAKON - TRANSPORT AUS DEN ERYTHROCYTEN IN DAS UMGEBENDE MEDIUM .

Den vier nun folgenden Experimenten ist gemeinsam, daß bei ihnen zum Herstellen der Erythrocyten-Suspensionen (mit Blut-Plasma oder PBS-Puffer) auch solche Erythrocyten Verwendung fanden, welche bereits zuvor - als Vollblut, in einem anderen Plasma suspendiert - mit Ax inkubiert worden waren ("Vorinkubation"). Diese Erythrocyten enthielten also bereits Ax, At (und Nt), entsprechend den Verhältnissen bei den bisher dargestellten Versuchen.

Nach dem Abtrennen der pharmakonbeladenen roten Blutzellen vom ursprünglichen Plasma und ihrer Resuspension in einem anderen - pharmakonfreien - Medium, wird ein Teil der in ihnen enthaltenen Substanzen wieder nach außen (eben in dieses neue Medium) abgegeben.

Die Diffusion erfolgt also in entgegengesetzter Richtung wie bei den bisherigen Versuchen (und den bei den folgenden Experimenten durchgeführten Vergleichsinkubationen). Einzelheiten sind bei den jeweiligen Versuchsbeschreibungen angegeben.

Die Ergebnisse solcher Experimente sind deshalb besonders interessant, weil :

Ein Arzneimittelmetabolismus innerhalb der Erythrocyten in vivo ist für die systemische Wirkung des Pharmakons nur dann von Bedeutung, wenn die entstandenen Metaboliten wieder im Plasma erscheinen !

Nur vom Plasma aus können sie andere Strukturen des menschlichen Körpers erreichen und dort eine Wirkung entfalten bzw. weiter metabolisiert werden.

In erster Linie kommen, für den therapeutischen Effekt das Zentralnervensystem und für Abbau und Ausscheidung die Leber und Niere in Betracht.

Mit den folgenden Versuchen sollte nun geklärt werden, ob und in welchem Maße das intraerythrocytär gebildete Amitriptylin in das Blut-Plasma abgegeben werden kann, da aus den bisherigen Experimenten (kaum Amitriptylin im Medium nachweisbar) nicht eindeutig hervorgeht, ob die Pharmaka nur in einer Richtung, aus dem Medium in die roten Blutzellen übertreten und dann dort (einschließlich ihrer Metaboliten) gebunden werden, oder ob ein Austausch zwischen beiden Kompartimenten möglich ist.

Die erneute Suspension vorinkubierter Erythrocyten in frischem Plasma schafft ein starkes Konzentrationsgefälle zwischen dem pharmakonbeladenen Erythrocyten-Inneren und dem pharmakonfreien Medium.

Es ist also anzunehmen, daß die Substanzen entlang diesem Konzentrationsgefälle aus den roten Blutzellen in das frische Medium ausströmen.

17.) V E R G L E I C H :

Pharmakontransport aus dem Plasma
in die Erythrocyten -
Pharmakontransport aus den
Erythrocyten ins Plasma .

Zum Vergleich des Pharmakontransportes aus dem Blut-Plasma in die roten Blutzellen (wie er bei allen bisher beschriebenen Experimenten stattfand) mit dem Substanz-Ausstrom aus "beladenen" Erythrocyten in frisches Plasma, wurden einerseits unbehandelte Erythrocyten in pharmakonhaltigem Plasma und andererseits vorinkubierte Erythrocyten in pharmakonfreiem Plasma suspendiert.

Es kam sowohl Amitriptylin-N-Oxid als auch Amitriptylin zu Einsatz, um die Transportvorgänge mit und ohne Berücksichtigung einer N-Oxid-Reduktion beurteilen zu können.

VERSUCHSDURCHFÜHRUNG:

a) Vorinkubation (Beladen von Erythrocyten mit Ax bzw. At)

5 ml Vollblut (HK: 50 %) + 50.000 ng Ax und
4 ml Vollblut (HK: 50 %) + 40.000 ng Amitriptylin
30 Minuten bei 37 ° C inkubiert .

(Es ist nötig, so hohe Pharmakon-Mengen zu verwenden, da mit einem intraerythrocytären Anteil von 20 % gerechnet werden muß - s. o. - und nur dieser steht im weiteren Versuchsablauf für den Auswärtstransport zur Verfügung.)

Das Plasma wird nach der Vorinkubation verworfen, und die Erythrocyten für die Hauptinkubation verwendet bzw. analysiert.

b) Hauptinkubation (Untersuchung des Pharmakon-Stromes)

(1) 0,5 ml vorinkubierte Erys + 0,5 ml frisches Plasma
(2) 0,5 ml frische Erys + 0,5 ml Plasma + 2.500 ng Ax
bzw. 2.500 ng At
je 30 Minuten bei 37 ° C inkubiert
jeweils Doppelbestimmungen .

ERGEBNISSE:

Ergebnis-Tabellen mit Angabe der Nanogramm, der Prozentanteile für jedes Kompartiment einzeln sowie der Substanzverteilung und des Gesamtumsatzes,
s. Anhang, Tab. 80 - 83.

Ergebnisse in Prozenten, für Erythrocyten und Plasma
gemeinsam, s. Tab. 23.

Tabelle 23

Prozentualer Anteil des in den Erythrocyten bzw. im Plasma meßbaren At bzw. Ax nach Inkubationen von

- Suspensionen von 0,5 ml pharmakonfreien Erythrocyten in 0,5 ml Plasma, in dem 2.500 ng Ax bzw. At enthalten sind. ("Transport-Richtung: Plasma → Erys")
- Suspensionen von 0,5 ml (durch eine vorhergehende Vorinkubation in Plasma mit Ax bzw. At) pharmakonhaltigen Erythrocyten in 0,5 ml pharmakonfreiem Plasma. ("Transport-Richtung: Erys → Plasma")

zugegebenes Pharmakon	Kompartiment	Analyse	Transport-Richtung :	
			Plasma → Erys	Erys → Plasma
AX	Erys	At	11	11
		Ax	5	7
	Plasma	At	1	1
		Ax	83	81
Ami-triptylin	Erys	At	36	34
	Plasma	At	64	66

Vorinkubation der pharmakonhaltigen Erythrocyten:

5 ml Vollblut + 50 mg Ax bzw. 4 ml Vollblut + 40 mg At.

Transport-Richtung: Erys → Plasma bedeutet:

bei einer Inkubation von vorinkubierten Erythrocyten mit frischem Plasma strömt Ax bzw. At aus den Erythrocyten in das Plasma aus.

Jeweils Doppelbestimmungen, Werte gemittelt.

Es gilt: (At + Ax) in Erythrocyten + Plasma = 100 %.

Zur Veranschaulichung der Ergebnisse, s. Abb. 24.

Inkubationen unter Verwendung von
A M I T R I P T Y L I N - N - O X I D



Inkubationen unter Verwendung von A M I T R I P T Y L I N

Transport-Richtung :

Plasma > Erythrocyten

Erythrocyten > Plasma

Ausgangs-
Situation

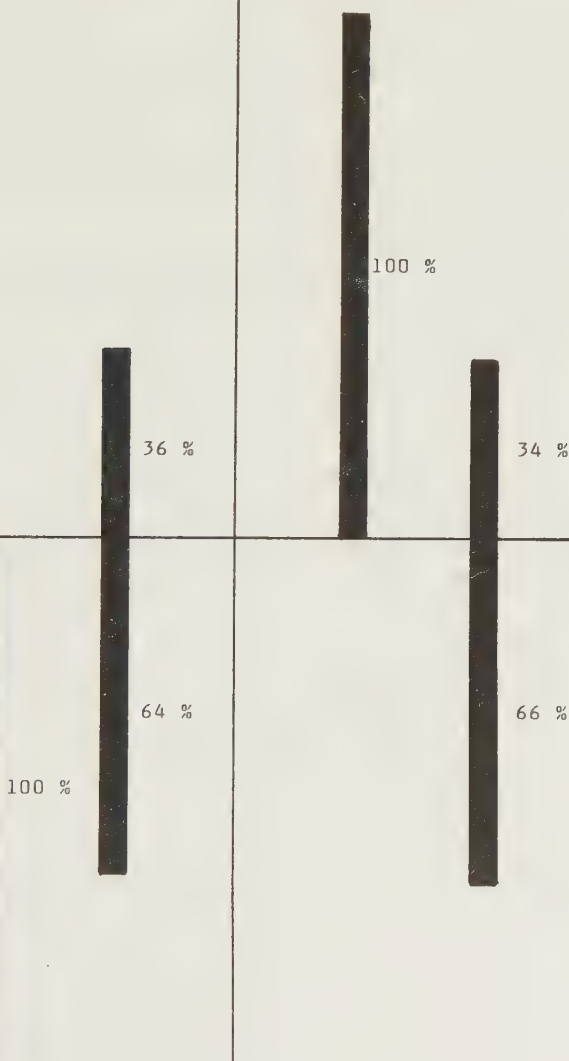
nach
Inkubation

Ausgangs-
Situation

nach
Inkubation

ERYTHROCYTEN

PLASMA



Legende, siehe folgende Seite

Abb. 24 (vorstehende Doppelseite)

Graphische Darstellung

- des innerhalb der Erythrocyten bzw. im Plasma meßbaren Pharmakonanteils ($> At + Ax <$ bei Ax-Inkubation; $> At <$ bei At-Inkubation)
- des innerhalb der beiden Kompartimente (Erythrocyten und Plasma) meßbaren Anteils von At bzw. Ax

vor ("Ausgangssituation") und nach Inkubationen von

- Suspensionen von 0,5 ml pharmakonfreien Erythrocyten mit 0,5 ml Plasma, in dem 2.500 ng Ax bzw. At enthalten sind:
("Transport-Richtung: Plasma $\rightarrow$ Erythrocyten")
- Suspensionen von 0,5 ml (durch eine vorhergehende Inkubation in Plasma mit Ax bzw. At) pharmakonhaltigen Erythrocyten mit 0,5 ml pharmakonfreiem Plasma:
("Transport-Richtung: Erythrocyten $\rightarrow$ Plasma")
(Vorinkubation der pharmakonhaltigen Erythrocyten:
5 ml Vollblut + 50 mg Ax bzw. 4 ml Vollblut + 40 mg At)

Die Höhe der Säulen symbolisiert immer 100 % der im gesamten Inkubationsansatz vorhandenen oder meßbaren Pharmakonmenge:

- bei den Inkubationen mit Ax:
At + Ax in Erythrocyten + Plasma
- bei den Inkubationen mit At:
At in Erythrocyten + Plasma

 : Amitriptylin /  : Amitriptylin-N-Oxid

a) Substanzverteilung

(s. auch Abb. 24 und Anhang, Tabelle 82)

Nach dem Pharmakontransport aus den Erythrocyten in das Plasma ergibt sich eine identische Verteilung zwischen den beiden Kompartimenten, wie beim üblichen Pharmakontransport in der entgegengesetzten Richtung.

Dies gilt sowohl für die Inkubation von Amitriptylin, als auch für die von Amitriptylin-N-Oxid.

Es besteht also ein Verteilungsgleichgewicht (bezüglich der Gesamtsubstanz: Ax + AT) zwischen Erythrocyten und Blut-Plasma, welches sich einstellt, unabhängig davon, in welchem Kompartiment sich die Substanzen bei Inkubationsbeginn befinden.

Also ist eine ungehinderte Diffusion der Pharmaka in beiden Richtungen möglich.

Wie auch in Experiment Nr. 15.) festgestellt wurde, befindet sich At bei At-Inkubation zu einem höheren (mit 35 % hier etwa doppeltem) Anteil innerhalb der roten Blutzellen als die Gesamtsubstanz (Ax + At) bei Inkubation des N-Oxids (dort sind es 17 %) .

b) Umsatz bei Amitriptylin-N-Oxid-Inkubation

(s. auch Abb. 24 und Anhang, Tabellen 81 und 83)

Auch der Anteil der Pharmaka, der innerhalb der Erythrocyten, bzw. im Plasma in reduzierter Form (als Amitriptylin) vorliegt, ist nach beiden Hauptinkubationen in etwa gleich und entspricht den Verhältnissen bei der Vorinkubation: jeweils zwischen 60 % und 70 % At (40 % - 30 % Ax) in den Erythrocyten und 1 % bis 2 % im Plasma.

Damit ist auch der Gesamtumsatz (Amitriptylin-Anteil in Erythrocyten + Plasma) bei beiden Pharmakontransport-Richtungen der gleiche: er beträgt beide Male 12 %.

Dies ist das bemerkenswerteste Ergebnis, denn es bedeutet, daß nach dem Ausstrom von Ax und Amitriptylin aus den vorinkubierten Erythrocyten weniger tertiäres Amin (eben die erwähnten 12 %) vorliegt, als innerhalb der Erythrocyten nach der Vorinkubation: dort sind es 64 %.

Es besteht also auch ein Umsatzgleichgewicht, das heißt ein konstanter Amitriptylin-Anteil, welcher sich unabhängig davon einstellt, ob das Pharmakon als Ax aus dem Blut-Plasma in die Erythrocyten diffundiert, oder als ein Gemisch von Ax und Amitriptylin aus den Erythrocyten in das Plasma übertritt.

Im letzteren Fall muß zum Erreichen des Umsatzgleichgewichtes ein Rückumsatz (At $\rightarrow$ Ax) während der Neuverteilung der Pharmaka angenommen werden.

Für Nortriptylin scheint es ein solches Umsatzgleichgewicht nicht zu geben: Auch wenn mit den in dieser Arbeit verwendeten Methoden keine genauen quantitativen Aussagen über Nt gemacht werden können, zeigt ein Blick auf Tab. 80 (Anhang), daß nach dem Pharmakontransport aus den Erythrocyten ins Plasma erheblich höhere Nt-Mengen gemessen wurden, als im umgekehrten Fall.

ZUSAMMENFASSUNG:

Resuspension vorinkubierter Erythrocyten in frischem Plasma führt - sowohl nach Ax- als auch nach At-Inkubation - zu einem Pharmakonausstrom in dieses neue Plasma, bis die auch sonst übliche Substanzverteilung erreicht ist:

"Verteilungsgleichgewicht".

Bei N-Oxid-Inkubation läßt sich nach der Neuverteilung die in den Erythrocyten nach der Vorinkubation messbare Amitriptylin-Menge nicht mehr nachweisen; Amitriptylin hat ab-, Amitriptylin-N-Oxid hat zugenommen:

"Umsatzgleichgewicht".

18.) Die Bedeutung des Mediums für
den Pharmakotransport in die
Erythrocyten hinein bzw. aus
ihnen heraus.

Um den Einfluß von Art und Menge des die Erythrocyten umgebenden Mediums auf den Substanztransport in beiden Richtungen (aus dem Medium in die Erythrocyten, bzw. aus diesen ins Medium) und auf den Anteil des gebildeten Amitriptylins zu untersuchen, wurde in diesem Experiment als Medium einerseits PBS-Puffer und andererseits Blut-Plasma (letzteres in unterschiedlichen Volumina) verwendet. Jeder Wert wurde doppelt bestimmt.

VERSUCHSDURCHFÜHRUNG:

a) Vorinkubation (Beladen der Erythrocyten mit Ax)

je 1 ml Vollblut (HK: 50 %) + 10.000 ng Ax
20 Minuten bei 37 ° C inkubiert

Erythrocyten vom Plasma getrennt und analysiert, bzw.
in der Hauptinkubation weiterverwendet.

b) Hauptinkubation

(1) 0,5 ml vorinkubierte Erythrocyten + eine unterschiedliche Menge Blut-Plasma bzw. PBS-Puffer

(2) 0,5 ml frische Erythrocyten + eine unterschiedliche Menge Plasma bzw. PBS-Puffer + 2.000 ng Ax
je 20 Minuten bei 37 ° C inkubiert

jeweils Doppelbestimmungen.

Der genaue Versuchsablauf ist in folgendem Schema 6 dargestellt.

SCHEMA ZUR VERSUCHSDURCHFÜHRUNG

HAUPTINKUBATION

10. x

je 1 ml Vollblut + 10.000 ng A X 20 Minuten bei 37 ° C inkubiert Trennen von Erythrocyten und Plasma			
ANALYSE 2 x			
je 0,5 ml Plasma verwerfen			
je 500 µl Erythrocyten			
+ 250 µl Plasma	+ 500 µl Plasma	+ 1 ml Plasma	+ 500 µl Puffer
20 Minuten bei 37 ° C Trennen von Erythrocyten und Medium			
ANALYSE 2 x	ANALYSE 2 x	ANALYSE 2 x	ANALYSE 2 x

8 x

je 500 µl frische Erythrocyten			
+ 250 µl Plasma	+ 500 µl Plasma	+ 1 ml Plasma	+ 500 µl Puffer
+ je 2.000 ng A X 20 Minuten bei 37 ° C Trennen von Erythrocyten und Medium			
ANALYSE 2 x	ANALYSE 2 x	ANALYSE 2 x	ANALYSE 2 x

Schema 6

ERGEBNISSE:

Ergebnis-Tabellen mit Angabe der Nanogramm, der Prozentanteile für jedes Kompartiment einzeln sowie der Substanzverteilung und des Gesamtumsatzes, s. Anhang, Tab. 84 - 88.

Ergebnisse in Prozenten, für Erythrocyten und Medium gemeinsam, s. Tab. 24.

Tabelle 24

Prozentualer Anteil des in den Erythrocyten bzw. im Medium (Plasma / PBS-Puffer - plasmaiton, pH 7,4) meßbaren At bzw. Ax nach Inkubationen von

- Suspensionen von 0,5 ml Erythrocyten in 0,5 ml Plasma unter Zugabe von 10.000 ng Ax.

Erythrocyten aus solchen Inkubationen ("Vorinkubation") wurden weiterverwendet:

- Suspensionen von 0,5 ml vorinkubierten, pharmakonhaltigen Erythrocyten in den angegebenen Volumina Plasma bzw. PBS-Puffer.

("Hauptinkubation ; Transportrichtung: Erys → Medium")

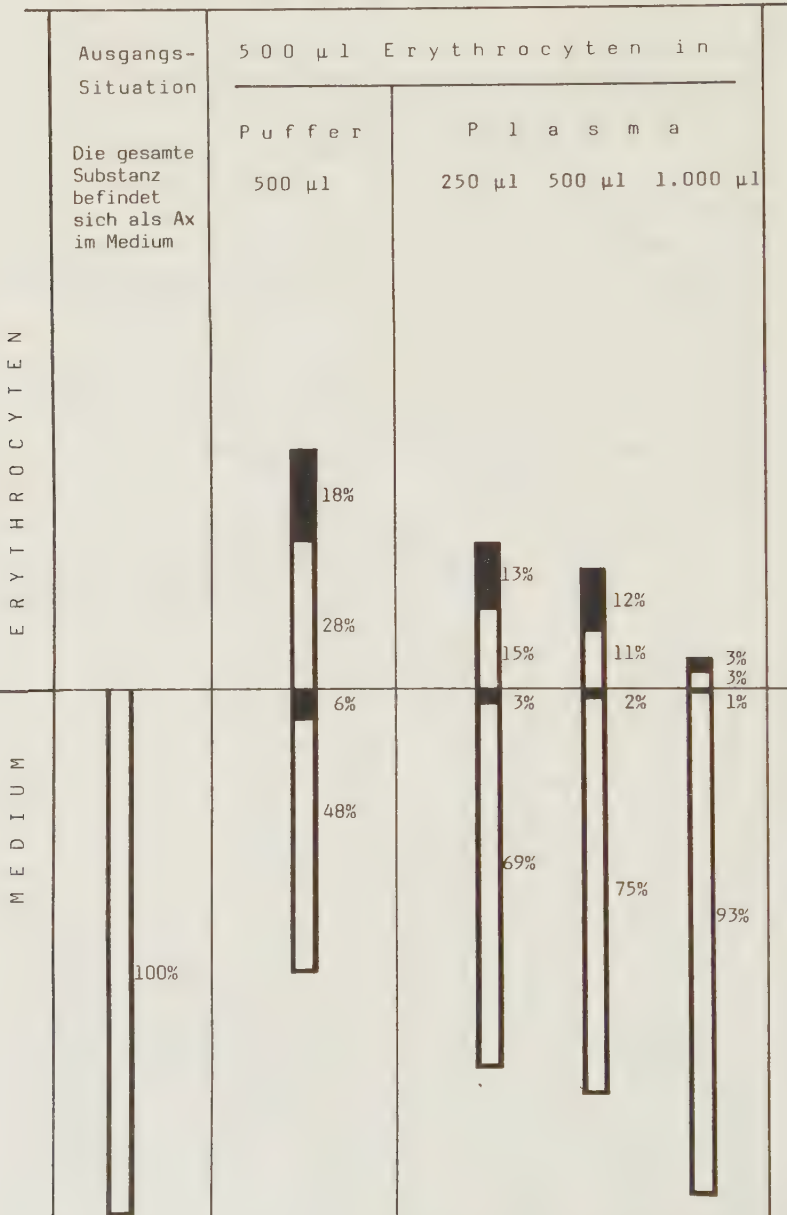
- Suspensionen von 0,5 ml pharmakonfreien Erythrocyten in den angegebenen Volumina Plasma bzw. PBS-Puffer unter Zugabe von 2.000 ng Ax.

("Hauptinkubation ; Transportrichtung: Medium → Erys")

				250 µl Plasma	500 µl Plasma	1000 µl Plasma	500 µl Puffer
VORINKUBATION	Transport- Richtung: PLASMA → ERY	Erys	At		10		
			Ax		10		
		Plasma	At		1		
			Ax		79		
HAUPTINKUBATION	Transport- Richtung: MEDIUM → ERY	Erys	At	13	12	3	18
			Ax	15	11	3	28
		Medium	At	3	2	1	6
			Ax	69	75	93	48
	Transport- Richtung: ERY → MEDIUM	Erys	At	26	13	8	23
			Ax	16	10	6	29
		Medium	At	5	1	1	7
			Ax	53	76	85	41

Jeweils Doppelbestimmungen, Werte gemittelt.

PHARMAKONTRANSPORT AUS DEM MEDIUM IN DIE ERYTHROCYTEN



PHARMAKONTRANSPORT AUS DEN ERYTHROCYTEN IN DAS MEDIUM

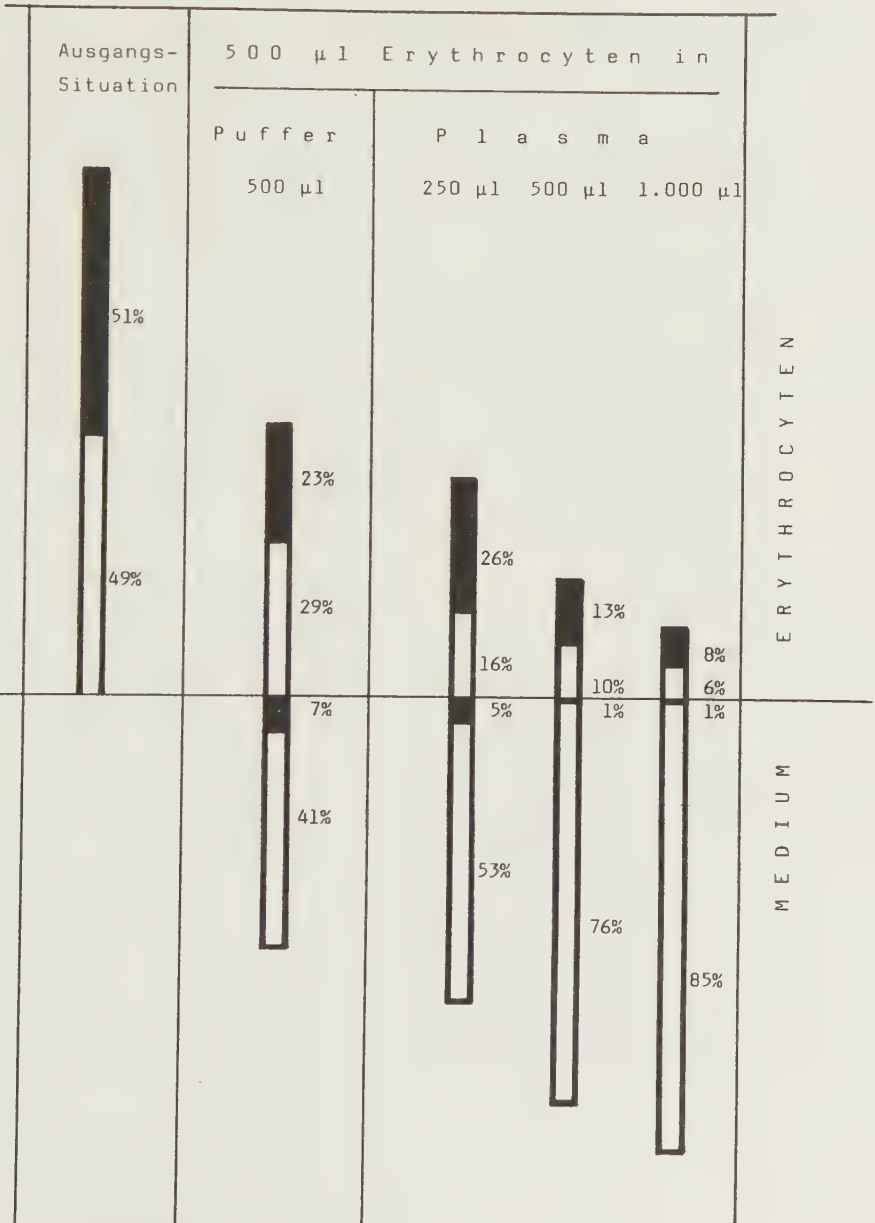


Abb. 25 (vorstehende Doppelseite)

Graphische Darstellung

- des innerhalb der Erythrocyten bzw. im Medium (Plasma / PBS-Puffer - plasmaisoton, pH 7,4) meßbaren Pharmakonanteils (At + Ax)
- des innerhalb der beiden Kompartimente (Erythrocyten / Medium) meßbaren Anteils von At bzw. Ax

■ : Amitriptylin / □ : Amitriptylin-N-Oxid

vor ("Ausgangssituation") und nach Inkubationen von

- Suspensionen von 0,5 ml pharmakonfreien Erythrocyten in den angegebenen Volumina Plasma (0,25 ml; 0,5 ml; 1,0 ml) bzw. 0,5 ml PBS-Puffer unter Zugabe von je 2.000 ng Ax.

("Pharmakontransport aus dem Medium in die Erythrocyten")

- Suspensionen von 0,5 ml vorinkubierten, pharmakonhaltigen Erythrocyten in den angegebenen Volumina Plasma (0,25 ml; 0,5 ml; 1,0 ml) bzw. in 0,5 ml PBS-Puffer.

("Pharmakontransport aus den Erythrocyten in das Medium")

Die "Vorinkubation" geschah dabei folgendermaßen:

0,5 ml Erythrocyten + 0,5 ml Plasma + 10 mg Ax.

Der innerhalb dieser Erythrocyten meßbare Anteil von At bzw. Ax ist unter "Ausgangssituation" angegeben.

Die Höhe der Säulen symbolisiert immer 100 % der im gesamten Inkubationsansatz vorhandenen bzw. meßbaren Pharmakonmenge:

At + Ax in Erythrocyten + Medium = 100 %

a) Substanzverteilung

(s. auch Abb. 25 und Anhang, Tab. 87)

(1) Pharmakontransport aus dem Medium in die Erythrocyten

Zunächst zeigt dieses Experiment die Abhängigkeit des intraerythrocytären Substanzanteils nicht nur von der A r t d e s M e d i u m s (Blut-Plasma oder PBS-Puffer), sondern auch von seiner M e n g e :

Je mehr Plasma sich um die Erythrocyten herum befindet, desto mehr Pharmakon bleibt in diesem Plasma zurück und entsprechend weniger wird von den roten Blutzellen aufgenommen. Bei einem Hämatokrit-Wert von 50 % sind es (wieder) ca. 20 % (sowohl bei der Vorinkubation mit sehr hohen Mengen von Ax , als auch bei der Hauptinkubation), bei der halben Plasma-Menge 28 % und bei der doppelten 6 %.

Der größte intraerythrocytär Substanzanteil wurde auch hier wieder bei der Inkubation der Erythrocyten-in-Puffer-Suspension (entsprechend einem HK-Wert von 50 %) gefunden. Er ist mit 46 % noch erheblich höher als bei Verwendung der geringsten Plasma-Menge von 250 µl.

Das ist ein weiterer Hinweis auf die Bedeutung der Plasmaproteine für die Verteilung der Pharmaka zwischen den beiden Kompartimenten Erythrocyten und Plasma.

(2) Pharmakontransport aus den Erythrocyten ins Medium

Wie schon in Experiment 17.) ergeben sich auch hier nach dem Pharmakontransport aus vorinkubierten Erythrocyten in frisches Medium ganz ähnliche Verhältnisse wie beim normalen Substanzstrom in der umgekehrten Richtung.

Die Substanzverteilungen, die sich nach Resuspension der roten Blutzellen in PBS-Puffer bzw. verschiedenen Mengen Blut-Plasma ergeben, verhalten sich relativ zueinander genau so wie in Punkt (1) dargestellt:

Intraerythrocytärer Substanzanteil bei :

500 µl Puffer	> 250 µl Plasma	> 500 µl Plasma	> 1000 µl Plasma
(52 %)	(42 %)	(23 %)	(14 %)

Es fällt auf, daß dieser intraerythrocytäre Substanzanteil hier jedoch stets deutlich höher ist als nach dem Pharmakontransport aus dem Medium in die Erythrocyten. Dies könnte einerseits dadurch bedingt sein, daß das Verteilungsgleichgewicht bei den beiden entgegengesetzten Transportrichtungen doch nicht ganz identisch ist, oder dieses Gleichgewicht nach der Inkubationszeit von 20 Minuten noch nicht ganz erreicht ist. (In jedem Fall besteht eine gewisse Diskrepanz zu den Ergebnisse von Experiment 17.).)

Zwar wird in Puffer weniger Pharmakon gefunden, als in einem nur halb so großen Plasmavolumen, dennoch ist es bemerkenswert, daß sich - bei beiden Transportrichtungen - in Erythrocyten und Puffer etwa gleich viel Substanz befindet. Diese Verteilung spricht gegen eine Bindung der Pharmaka an Hämoglobin oder andere Bestandteile der roten Blutzellen.

b) Umsatz

(s. auch Abbildungen 25, 26 und 27 sowie Anhang, Tab. 85 und 88)

Amitriptylin-Anteil innerhalb der Erythrocyten

Der Amitriptylin-Anteil innerhalb der Erythrocyten zeigt keine systematische Abhängigkeit von der Menge des umgebenden Plasmas. Bei den Erythrocyten-in-Puffer-Suspensionen ist er stets geringer als bei den anderen Inkubationen.

Auffallend ist, daß nach dem Pharmakontransport aus den Erythrocyten ins Medium der intraerythrocytäre Amitriptylin-Anteil stets höher ist als nach dem Transport aus dem Medium in die Erythrocyten, und auch höher als bei der Vorinkubation (letzteres gilt nicht für die Erythrocyten-in-Puffer-Suspensionen) (s. Abb. 26).

Amitriptylin-Anteil im Medium

Der Amitriptylin-Anteil im Medium ist bei beiden Transport-Richtungen vergleichbar und recht gering (wenige Prozent).

Gesamtumsatz

Daher ist der Gesamtumsatz in erster Linie vom intraerythrocytären Substanzanteil (und in zweiter Linie vom dortigen Umsatz) abhängig. Dies trifft auch für die Versuche mit Substanztransport aus den Erythrocyten ins Medium zu; das heißt:

Beim Austransport der Substanzen aus den Erythrocyten ins Medium bleibt das in den vorinkubierten Erythrocyten gemessene Amitriptylin nicht erhalten. Je mehr Pharmakon in das Medium ausströmt, desto geringer wird der Amitriptylin-Anteil im Gesamtansatz (Erythrocyten + frisches Medium).

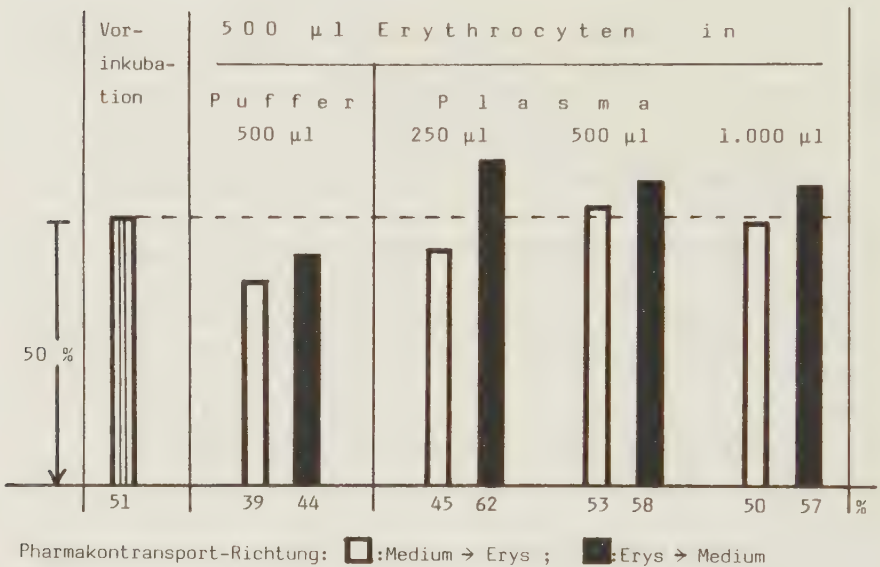


Abb. 26

Graphische Darstellung des innerhalb der Erythrocyten in Form von At vorliegenden Gesamt-Pharmakons (At + Ax) nach Inkubationen von

- Suspensionen von 0,5 ml Erythrocyten in 0,5 ml Plasma unter Zugabe von 10.000 ng Ax ("Vorinkubation")
- Suspensionen von 0,5 ml pharmakonhaltigen (aus der beschriebenen Vorinkubation stammenden) Erythrocyten in den angegebenen Volumina pharmakonfreien Plasmas bzw. PBS-Puffers (plasmaisoton, pH 7,4) : ■
- Suspensionen von 0,5 ml pharmakonfreien Erythrocyten in den angegebenen Volumina Plasma bzw. PBS-Puffer unter Zugabe von 2.000 ng Ax : □

Für die Berechnung der Ergebnisse gilt:

$$\text{At} + \text{Ax} \quad \text{in den Erythrocyten} \quad = \quad 100 \%$$

(Es liegen die gemittelten Werte aus Tab. 85, Anhang zugrunde.)

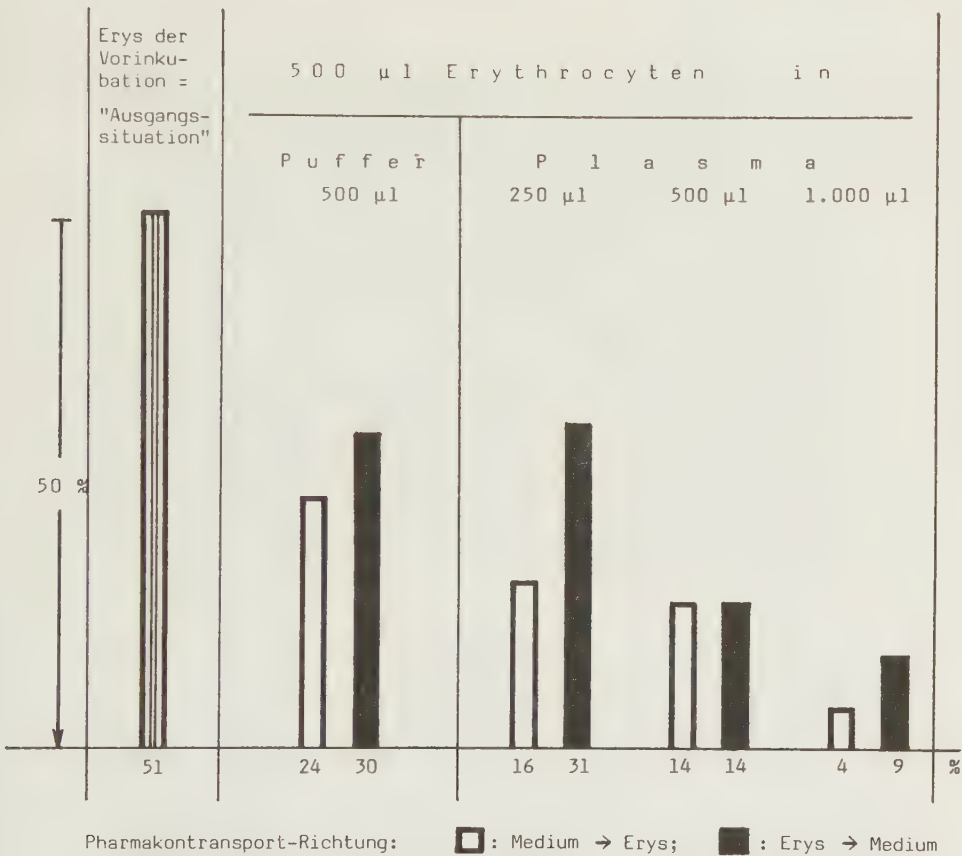


Abb. 27 . Graphische Darstellung des im gesamten Inkubationsansatz (Erythrocyten + Medium) als At meßbaren Gesamt-Pharmakons (At + Ax) nach Inkubationen von

- Suspensionen von 0,5 ml pharmakonfreien Erythrocyten in den angegebenen Volumina Plasma bzw. PBS-Puffer (plasmaisoton, pH 7,4) unter Zugabe von 2.000 ng Ax : 
- Suspensionen von 0,5 ml pharmakonhaltigen (aus der Vorinkubation - s. u. - stammenden) Erythrocyten in den angegebenen Volumina Plasma bzw. PBS-Puffer : 

(Berechnung: At + Ax in Erythrocyten + Medium = 100 %)

Die zum Vergleich dienende "Ausgangssituation" () ist der nach der Vorinkubation (0,5 ml Erys + 0,5 ml Plasma + 10 mg Ax) innerhalb der Erythrocyten als At meßbare Pharmakonanteil.

(Berechnung: At + Ax in Erythrocyten = 100%)

Dennoch gilt auch hier (analog zum Amitriptylin-Anteil innerhalb der Erythrocyten), daß der Gesamtumsatz nach dem Pharmakontransport aus den Erythrocyten ins Medium höher ist als bei der entsprechenden Vergleichsinkubation. (Das heißt: Die Verhältnisse nach dem Substanztransport Erythrocyten $\rightarrow$ Medium gleichen sich denen beim Transport Medium $\rightarrow$ Erythrocyten zwar weitgehend, aber nicht vollständig an.)

Mit anderen Worten:

Der in Experiment 17.) vorgeschlagene "Rückumsatz" läuft (zumindest während der Inkubationszeit von 20 Minuten) nicht ganz bis zum Erreichen eines "Umsatzgleichgewichtes" ab, sondern von dem höheren Amitriptylin-Anteil innerhalb der Erythrocyten nach der Vorinkubation bleibt nach dem Pharmakonausstrom etwas mehr tertiäres Amin erhalten, als in den Vergleichsinkubationen entsteht (s. Abb. 27).

ZUSAMMENFASSUNG:

Je höher der Hämatokrit-Wert eines Vollblutes ist, desto mehr Pharmakon wird von den Erythrocyten aufgenommen, bzw. bleibt in ihnen zurück (weniger Plasmaproteine).

Trotz der Abnahme der Gesamt-At-Menge nach Pharmakonausstrom aus vorinkubierten Erythrocyten in frisches Plasma, bleibt etwas mehr At erhalten, als in Vergleichsinkubationen gebildet wird.

19.) Pharmakontransport aus den
Erythrocyten in das Medium
in zwei Schritten.

In den letzten beiden Experimenten zeigte sich, daß die intraerythrocytäre Gesamtsubstanz (Amitriptylin-N-Oxid + Amitriptylin) nach ihrem Ausstrom in frisches Medium dort weitestgehend als N-Oxid vorliegt. Das heißt, die gesamte im Ansatz gemessene Amitriptylin-Menge hat nach dem Auswärtstransport abgenommen und die Ax-Menge in entsprechendem Maße zugenommen.

Dieses Phänomen sollte nun weiter untersucht werden, indem die Erythrocyten nach der Vorinkubation nicht (wie bisher) nur einmal in frischem Plasma bzw. Puffer suspendiert wurden, sondern nach dieser 1. Hauptinkubation noch ein zweites Mal.

Auf jeder Stufe des Experimentes wurden relativ kleine Mengen der Medien und Erythrocyten zur Analyse entnommen und jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt.

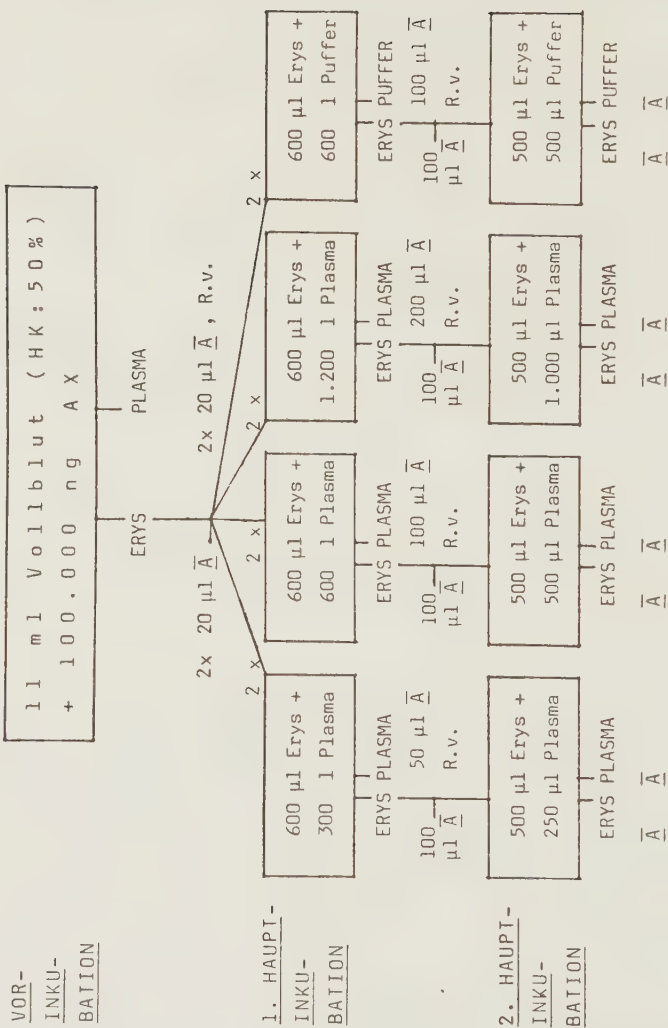
Wie bereits in Versuch 18.) kamen auch hier verschiedene Plasma-Mengen zum Einsatz.

VERSUCHSDURCHFÜHRUNG:

- a) Vorinkubation ("Beladen" der Erythrocyten mit Ax / At)
11 ml Vollblut + 100 mg Ax 20 Minuten bei 37°C inkubiert
Erythrocyten in der 1. Hauptinkubation weiterverwendet.
- b) 1. Hauptinkubation
je 600 µl vorinkubierte Erythrocyten + Plasma / Puffer
20 Minuten bei 37°C inkubiert.
Erythrocyten in der 2. Hauptinkubation weiterverwendet.
- c) 2. Hauptinkubation
je 500 µl Erythrocyten + Plasma / Puffer (s. Schema)
20 Minuten bei 37°C inkubiert.

Der genaue Versuchsablauf ist in folgendem Schema dargestellt.
Jeweils Doppelbestimmungen.

SCHEMA ZUR VERSUCHSDURCHFÜHRUNG:



$\bar{A}$: Analysieren ; R.v. : Rest verwerfen
je 20 Minuten bei 37°C inkubiert

Schema 7

ERGEBNISSE:

Ergebnis-Tabellen mit Angabe der Nanogramm, der Prozentanteile einzeln für jedes Kompartiment sowie der Substanzverteilung und des Gesamtumsatzes, s. Anhang, Tab. 89 - 93.

Ergebnisse in Prozenten, für Erythrocyten und Medium gemeinsam, s. Tab. 25.

Tabelle 25

Prozentualer Anteil des in den Erythrocyten bzw. im Medium (Plasma / PBS-Puffer - plasmamaisoton, pH 7,4) meßbaren At bzw. Ax nach Inkubationen von

- 11 ml Vollblut (HK-Wert 50 %) mit 100 mg Ax ("Vorinkubation").
- 600 µl vorinkubierten, also pharmakonbeladenen Erythrocyten, in verschiedenen Volumina (300 µl, 600 µl, 1.200 µl) Plasma bzw. in 600 µl PBS-Puffer resuspendiert ("1. Hauptinkubation").
- 500 µl vorinkubierten und einmal in verschiedenen Volumina Plasma/Puffer resuspendierten (s.o.) Erythrocyten, in verschiedenen Volumina (250 µl, 500 µl, 1.000 µl) Plasma bzw. in 500 µl PBS-Puffer erneut resuspendiert ("2. Hauptinkubation").

Berechnung: At + Ax in Erythrocyten + Medium = 100 %

			Erys / Plasma = 2 : 1	Erys / Plasma = 1 : 1	Erys / Plasma = 1 : 2	Erys / Puffer = 1 : 1
Vorinkubation	Erys	At		11		
		Ax		33		
	Plasma	At		0		
		Ax		56		
1. Haupt- inkubation	Erys	At	10	6	6	14
		Ax	25	15	8	29
	Medium	At	3	5	2	7
		Ax	62	74	84	50
2. Haupt- inkubation	Erys	At	11	12	10	27
		Ax	13	9	11	22
	Medium	At	2	0	0	4
		Ax	74	79	79	47

a) Substanzverteilung

(s. auch Anhang, Tabelle 92)

Bei der Vorinkubation wurden diesmal 44 % der zugegebenen Substanz von den roten Blutzellen aufgenommen.

In den beiden Hauptinkubationen sind die Pharmaka jedoch wieder so verteilt wie gewohnt:

Bei der Erythrocyten-in-Puffer-Suspension beträgt der intraerythrocytäre Substanzanteil (knapp) 50 %; bei den Suspensionen in Blut-Plasma (beim Volumen-Verhältnis 1:1) ca. 20 % (bei den doppelten Plasmamengen etwas weniger, bei den halben etwas mehr).

b) Umsatz

(s. auch Abb. 28 - 30 sowie Anhang, Tab. 90, 91, 93)

Entsprechend den Ergebnissen von Versuch 18.) zeigt sich auch hier, daß die innerhalb der Erythrocyten befindliche Substanz nach der 1. Hauptinkubation zu einem höheren Prozentsatz in reduzierter Form (als Amitriptylin) vorliegt als nach der Vorinkubation. (s. Abb. 28)

Nach der 2. Hauptinkubation liegen die Werte noch einmal deutlich darüber. (s. Abb. 28)

Im Medium ist der Amitriptylin-Anteil auch diesmal wieder sehr gering.

Daher ist auch bei diesem Experiment der Gesamtumsatz vor allem von der Substanzverteilung abhängig.

Das heißt, wie in den beiden letzten Experimenten bleibt die in den roten Blutzellen nach der Vorinkubation gemessene Amitriptylin-Menge nach der Resuspension (1. Hauptinkubation) nicht erhalten und nimmt nach der zweiten Resuspension (2. Hauptinkubation) weiter ab. (s. Abb. 29/30)

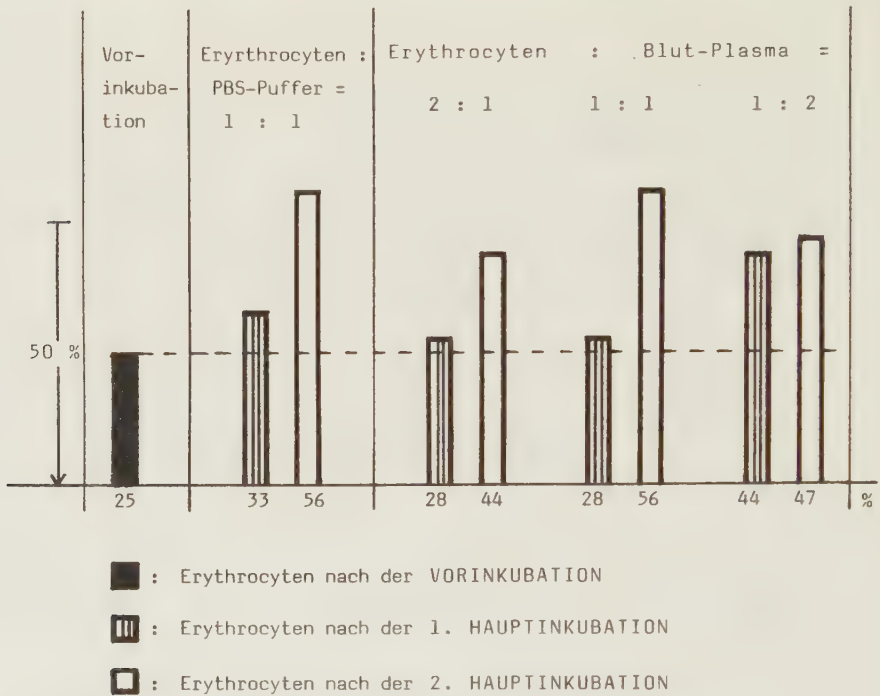


Abb. 28

Graphische Darstellung des innerhalb der Erythrocyten in Form von At meßbaren Gesamt-Pharmakons (At + Ax) nach Inkubationen von

- 11 ml Vollblut (HK-Wert 50 %) mit 100 mg Ax : ■ ("Vorinkubation")
- 600 µl vorinkubierten (pharmakonbeladenen) Erythrocyten, resuspendiert in verschiedenen Volumina (300 µl, 600 µl, 1.200 µl) Plasma bzw. in 600 µl PBS-Puffer (plasmaisoton, pH 7,4) :
 - ▨ : "Erythrocyten nach der 1. Hauptinkubation"
- 500 µl vorinkubierten und bereits einmal resuspendierten Erythrocyten, erneut resuspendiert in verschiedenen Volumina (250 µl, 500 µl, 1.000 µl) Plasma bzw. in 500 µl PBS-Puffer :
 - : "Erythrocyten nach der 2. Hauptinkubation"

Berechnung: At + Ax in Erythrocyten = 100 %

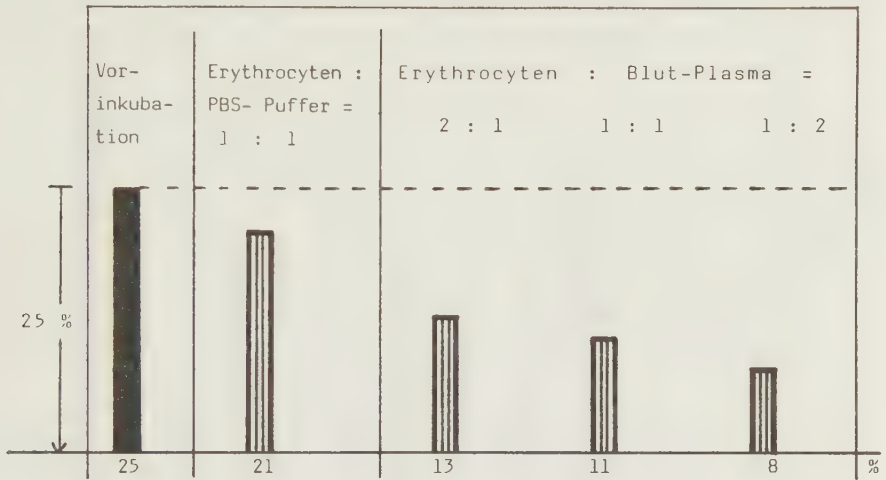


Abb. 29 A

Graphische Darstellung

- des nach der Vorinkubation (11 ml Vollbut + 100 mg Ax) innerhalb der Erythrocyten als At meßbares Pharmakon :
Berechnung: At + Ax in vorinkubierten Erys = 100 %
- des nach Resuspension von 600 µl vorinkubierten Erythrocyten in verschiedenen Volumina (300 µl, 600 µl, 1.200 µl) Plasma bzw. in 600 µl PBS-Puffer (plasmaisoton, pH 7,4) im gesamten Inkubationsansatz (Erythrocyten + Medium) meßbaren At :
Berechnung: At + Ax in Erys + Medium = 100 %



Abb. 29 B

Graphische Darstellung

- des nach der 1. Resuspension von 600 μ l vorinkubierter Erythrocyten* in verschiedenen Volumina (300 μ l, 600 μ l, 1.200 μ l) Plasma bzw. in 600 μ l PBS-Puffer (plasmaisoton, pH 7,4) innerhalb der Erythrocyten meßbaren At-Anteils :
Berechnung: $At + Ax$ in einmal resuspendierten Erys = 100
- des nach einer zweiten Resuspension von 500 μ l der selben Erythrocyten in verschiedenen Volumina (250 μ l, 500 μ l, 1.000 μ l) Plasma bzw. in 500 μ l PBS-Puffer im gesamten Inkubationsansatz (Erythrocyten + Medium) meßbaren At :
Berechnung: $At + Ax$ in Erys + Medium = 100 %

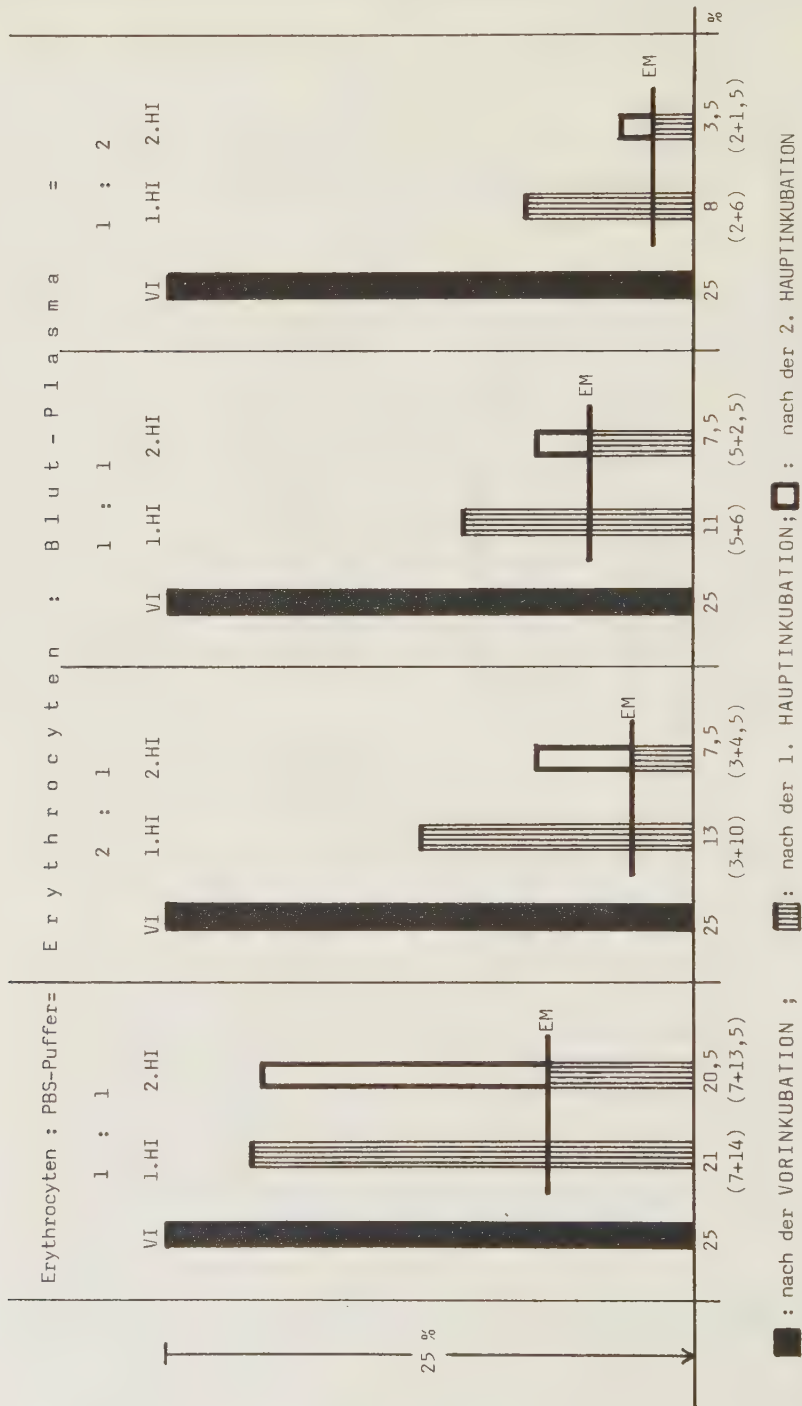
* Vorinkubation:

11 ml Vollblut (HK-Wert 50 %) + 100 μ g Ax

Abb. 30 (umstehend)

Graphische Darstellung

- des nach der Vorinkubation (11 ml Vollblut + 100 mg Ax) innerhalb der Erythrocyten als At meßbaren Pharmakons : 
Berechnung: $At + Ax$ in vorinkubierten Erys = 100 %
(Diese Säule ist viermal angegeben, da die Erythrocyten aus der Vorinkubation in drei verschiedenen Volumina Plasma bzw. in 600 µl PBS-Puffer resuspendiert wurden und das intraerythrocytäre At in den vorinkubierten Erythrocyten jedesmal als Vergleich dient.)
- des nach einer Resuspension von 600 µl vorinkubierten Erythrocyten in verschiedenen Volumina (300 µl, 600 µl, 1.200 µl) Plasma bzw. in 600 µl PBS-Puffer (plasmaisoton, pH 7,4) im gesamten Inkubationsansatz (Erythrocyten + Medium) meßbaren At : 
Berechnung: $At + Ax$ in Erythrocyten + Meidium = 100 %
(1. Resuspension = 1. Hauptinkubation = 1. HI)
Die Linie EM (für Erythrocyten-Membran) trennt dabei das innerhalb der Erythrocyten gefundene At (oberhalb der Linie) von dem im Medium befindlichen At (unterhalb der Linie).
Da das Gesamt-Pharmakon ($At + Ax$ in Erys + Medium) im Inkubationsansatz der 1. Hauptinkubation aus den Erythrocyten der Vorinkubation stammt (es hat sich nach der Resuspension der vorinkubierten Erythrocyten zwischen diesen und dem frischen Medium verteilt) zweigt die Differenz zwischen Säule VI (für Vorinkubation) und Säule 1.HI (für 1. Hauptinkubation) die At-Abnahme (mit einer entsprechenden Ax-Zunahme) nach einem Pharmakon-ausstrom aus den Erythrocyten ins Medium.



Fortsetzung der Legende zu Abb. 30

Weiterhin: Graphische Darstellung

- des nach einer zweiten Resuspension (2. Hauptinkubation = 2.HI) von 500 μ l der selben (vorinkubierten und bereits einmal resuspendierten) Erythrocyten in verschiedenen Volumina (250 μ l, 500 μ l, 1.000 μ l) Plasma bzw. in 500 μ l PBS-Puffer im gesamten Ansatz (Erythrocyten + Medium) meßbaren At : 

Dieses At ist als Teil des - nach der 1. Hauptinkubation - innerhalb der Erythrocyten meßbaren Gesamt-Pharmakons (At + Ax) dargestellt und errechnet sich folgendermaßen:

$$\frac{\% \text{ At in (Erys + Medium) nach 2. HI} \times \% (\text{At} + \text{Ax}) \text{ in Erys nach 1.HI}}{100}$$

darin bedeuten:

- $\% \text{ At in (Erys + Medium) nach 2.HI}$:

Nach der 2. Hauptinkubation im gesamten Ansatz (Erythrocyten + Medium) meßbares At. Berechnung: $\text{At} + \text{Ax in Erys + Medium} = 100 \%$ (vgl. Tab. 93, Anhang).

- $\% (\text{At} + \text{Ax}) \text{ in Erys nach 1.HI}$:

Nach der 1. Hauptinkubation innerhalb der Erythrocyten meßbarer Anteil des Gesamt-Pharmakons (At + Ax). Berechnung: $\text{At} + \text{Ax in Erys + Medium} = 100 \%$. (vgl. Tab. 92, Anhang)

Der unterhalb dieses Säulenabschnitts () dargestellte Säulenabschnitt ( - unter der Linie EM) ist mit dem entsprechenden Teil der Säule 1.HI () identisch; d.h., er gibt den At-Anteil im Medium nach der 1. Hauptinkubation an. (Da das Medium nicht weiterverwendet wird, kann das darin enthaltene At keinen Veränderungen mehr unterliegen und muß auf Säule 2.HI übertragen werden.)

Die Linie EM dient also gewissermaßen als zweite Grundlinie für den Vergleich der Säulen 1.HI und 2.HI.

ZUSAMMENFASSUNG:

Auch bei zweimaliger Resuspension vorinkubierter Erythrocyten in frischem Medium verteilt sich das Pharmakon jedesmal neu, und nimmt das gesamte Amitriptylin beide Male ab.

Aber auch hier ist der At-Anteil innerhalb der Erythrocyten und der Gesamtumsatz nach der Resuspension etwas höher als in Vergleichsinkubationen.

20.) Zeit- und Temperaturabhängigkeit
des Pharmakontransportes aus den
Erythrocyten in das Medium.

In diesem Experiment sollte der Pharmakonausstrom aus vorinkubierten Erythrocyten in frisches Plasma, in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur und der für den Austransport zur Verfügung stehenden Zeit untersucht werden.

Dazu wurde folgendermaßen vorgegangen :

Nach den Vorinkubationen (Beladen der Erythrocyten mit Ax bzw dem daraus entstehenden At) wurden in den einzelnen Reaktionsröhrchen die Erythrocyten und das Blut-Plasma durch Zentrifugation (5 Minuten bei 5 ° C) voneinander getrennt, aber vorerst noch in diesem gemeinsamen Inkubationsröhrchen belassen.

Die Hälfte der Röhrchen wurde nun weiterhin bei 37 ° C gehalten, die andere Hälfte im Eisbad auf 0 ° C abgekühlt. Der Austausch des alten Plasmas gegen das neue (Abpipettieren des bereits abzentrifugierten alten Plasmas, zugeben des frischen Plasmas und Vermischen desselben mit den vorinkubierten Erythrocyten) erfolgte nun zu verschiedenen Zeitpunkten, sodaß die pharmakonbeladenen Erythrocyten bis zur (für alle Ansätze gleichzeitigen) Analyse unterschiedlich lange mit dem Frischplasma Kontakt hatten.

VERSUCHSDURCHFÜHRUNG:

a) Vorinkubation (Beladen der Erythrocyten mit Ax / At)

je 1 ml Vollblut + 10.000 ng Ax

30 Minuten bei 37 ° C inkubiert (14 x) .

Erythrocyten und Plasma analysiert (2 x)

Erythrocyten in der Hauptinkubation weiterverwendet (12 x) .

b) Hauptinkubation (Ausstrom von Pharmakon aus den Erys ins Plasma)

(1) bei 37 ° C

je 500 µl vorinkubierte Erythrocyten

+ 500 µl Frischplasma (6 x)

2 Minuten / 5 Minuten / 30 Minuten inkubiert.

(2) bei 0 ° C

je 500 µl vorinkubierte Erythrocyten

+ 500 µl Frischplasma (6 x)

2 Minuten / 5 Minuten / 30 Minuten inkubiert.

Jeweils Doppelbestimmungen.

c) Vergleichsinkubation (Pharmakonstrom aus dem Plasma in die Erys)

(1) bei 37 ° C

je 500 µl frische Erythrocyten

+ 500 µl Plasma + 2.000 ng Ax

30 Minuten inkubiert (2 x) .

(2) bei 0 ° C

je 500 µl frische Erythrocyten

+ 500 µl Plasma + 2.000 ng Ax

30 Minuten inkubiert (2 x) .

Der genaue Versuchsablauf ist im folgenden Schema 8 dargestellt.

VOR-
INKUBATION

H A U P T I N K U B A T I O N

14 x

SCHEMA ZUR

VERSUCHSDURCH-

FÜHRUNG

je 1 ml Vollblut + 10.000 ng A X
30 Minuten bei 37 ° C inkubiert
Trennen von Erythrocyten und Blut-Plasma

ANALYSE 2 x		6 x		6 x	
37 ° C	0 ° C	3 7 ° C		0 ° C	
1 ml Vollblut + 2.000 ng A X 30 Minuten ink. Trennen von Erys u. Plasma		Plasma- tausch		Plasma- tausch	
		Plasma- tausch		Plasma- tausch	
		Plasma- tausch		Plasma- tausch	
		Plasma- tausch		Plasma- tausch	
ANALYSE 2 x	ANALYSE 2 x	2 min. ink.	5 min. ink.	2 min. ink.	5 min. ink.
		30 min. ink.		30 min. ink.	
Trennen von Erythrocyten und Blut-Plasma					
ANALYSE 2 x	ANALYSE 2 x	ANALYSE 2 x	ANALYSE 2 x	ANALYSE 2 x	ANALYSE 2 x

(Plasmatausch:

Austausch des alten Plasmas
(das bei der Vorinkubation
verwendet wurde) gegen
Frischplasma./

/Plasmatausch:

Austausch des alten Plasmas
(das bei der Vorinkubation
verwendet wurde) gegen
Frischplasma./

Schema 8

VERGLEICHINKUBATION

ERGEBNISSE:

Ergebnis-Tabellen mit Angabe der Nanogramm, der Prozentanteile einzeln für jedes Kompartiment sowie der Substanzverteilung und des Gesamtumsatzes, s. Anhang, Tab. 94 - 98.

Ergebnisse in Prozenten, gemeinsam für Erythrocyten und Plasma, s. Tab. 26.

Tabelle 26

Prozentualer Anteil des in den Erythrocyten bzw. im Plasma meßbaren At bzw. Ax nach Inkubationen - jeweils bei den beiden Temperaturen 37°C und 0°C - von

- 1 ml Vollblut mit 10.000 ng Ax ("Vorinkubation")
- 500 µl vorinkubierten (also pharmakonhaltigen) Erythrocyten, resuspendiert in je 500 µl pharmakonfreiem Plasma ("Hauptinkubation")
- 500 µl pharmakonfreien Erythrocyten, suspendiert in je 500 µl Plasma unter Zugabe von je 2.000 ng Ax ("Vergleichsinkubation")

wobei als Inkubationszeiten in der Hauptinkubation gewählt wurden: 2 Minuten, 5 Minuten und 30 Minuten. (In der Vor- und Vergleichsinkubation nur 30 Minuten).

Berechnung: At + Ax in Erythrocyten + Plasma = 100 %

Inkubationszeit	Kompartiment	Analyse	37 ° C			0 ° C	
			Vor-inkub.	Vergleichs-inkub.	HAUPT-INKUBATION	Vergleichs-inkub.	HAUPT-INKUBATION
2 Minuten	Erys	At			38		19
		Ax			30		19
	Plasma	At			0		0
		Ax			32		62
5 Minuten	Erys	At			42		18
		Ax			22		10
	Plasma	At			0		0
		Ax			36		72
30 Minuten	Erys	At	9	8	25	3	19
		Ax	10	6	21	3	13
	Plasma	At	0	0	0	0	0
		Ax	81	86	54	94	68

37°C

ERYTHROCYTEN
DER
VORINKUBATION

HAUPTINKUBATION

Austausch des "alten" Plasmas
gegen frisches und
Inkubation für:

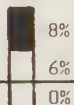
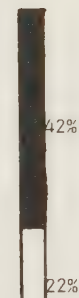
2 5 30
min. min. min.

VERGLEICHS-
INKUBATION

Hier wurden
die Pharmaka
aus dem
Plasma in
die Erythro-
cyten
transportiert

ERYTHROCYTEN

PLASMA



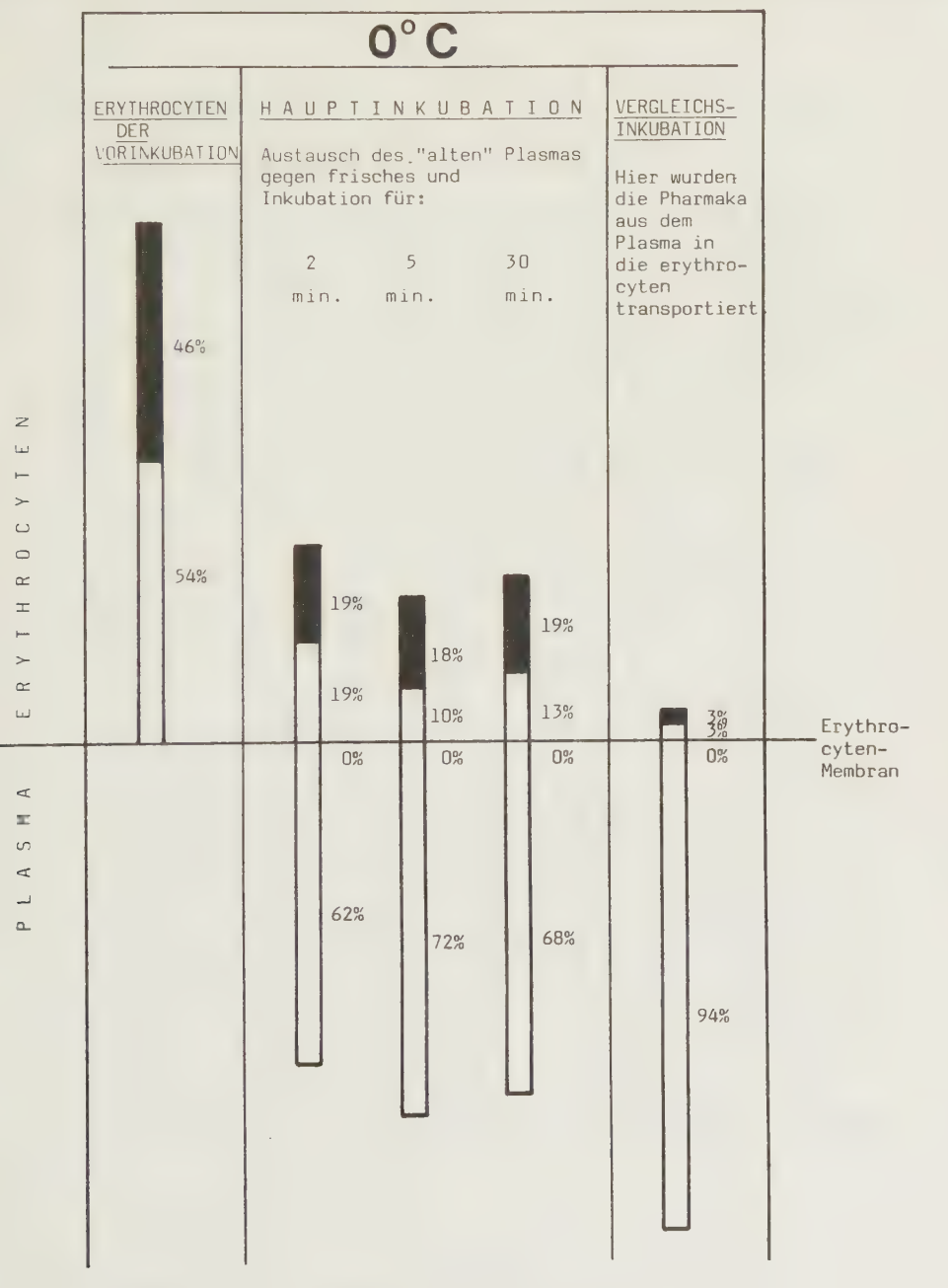


Abb. 31 (vorstehende Doppelseite)

Graphische Darstellung

- des in den Erythrocyten als At bzw. als Ax meßbaren Pharmakons

nach der Vorinkubation: 1 ml Vollblut (HK-Wert 50 %) mit 10.000 ng Ax inkubiert.

("Erythrocyten der Vorinkubation")

Berechnung: At + Ax in den Erythrocyten = 100 %

- des innerhalb der Erythrocyten bzw. im Plasma meßbaren Anteils des Gesamt-Pharmakons (At + Ax)
- des in den beiden Kompartimenten (Erythrocyten/Plasma) meßbaren Anteils von At bzw. Ax

nach Inkubationen von 500 µl vorinkubierten (pharmakonhaltigen) Erythrocyten, resuspendiert in 500 µl pharmakonfreiem Plasma, bei den beiden Temperaturen 37°C und 0°C und den Inkubationszeiten 2 Minuten, 5 Minuten und 30 Minuten.

("Hauptinkubation")

Berechnung: At + Ax in Erythrocyten + Plasma = 100 %

- des innerhalb der Erythrocyten bzw. im Plasma meßbaren Anteils des Gesamt-Pharmakons (At + Ax)
- des in den beiden Kompartimenten (Erythrocyten/Plasma) meßbaren Anteils von At bzw. Ax

nach Inkubationen von 500 µl pharmakonfreien Erythrocyten, suspendiert in 500 µl Plasma unter Zugabe von 2.000 ng Ax.

("Vergleichsinkubation")

Berechnung: At + Ax in Erythrocyten + Plasma = 100 %

■ : Amitriptylin / □ : Amitriptylin-N-Oxid

a) Substanzverteilung

(s. auch Abb. 31 und Anhang, Tab. 97)

Pharmakontransport aus dem Plasma in die Erythrocyten.

In der Vorinkubation und der 37°C-Vergleichsinkubation (jeweils 30 Minuten bei 37°C inkubiert) beträgt der intraerythrocytäre Substanzanteil knapp 20 % :

Vorinkubation: 19 % ; 37°C-Vergleichsinkubation: 14 % .

Bei der 0°C-Vergleichsinkubation ist dieser Anteil deutlich geringer. 6 % . (Auch in Experiment 16.), s. S. 129 ff, war der Substanzanteil innerhalb der Erythrocyten bei 0°C geringer als bei 37°C.)

Pharmakontransport aus den Erythrocyten ins Plasma.

37 ° C : Schon nach zweiminütiger Inkubation der vorinkubierten Erythrocyten in frischem Plasma ist ca. 1/3 des bei Inkubationsbeginn zu 100 % in den roten Blutzellen lokalisierten Pharmakons in das Plasma übertreten, nach 30 Minuten bereits mehr als die Hälfte:

Intraerythrocytärer Pharmakonanteil:

nach 2 Min.: 68 % ; nach 5 Min.: 64 % ; nach 30 Min.: 46 % .

Nach den Erfahrungen der letzten Experimente ist zu erwarten, daß bei genügend langer Inkubationszeit der Pharmakontransport aus den Erythrocyten ins Plasma noch so lange weitergegangen wäre, bis die Substanzverteilung (annähernd) den Verhältnisse bei der 37°C- Vergleichs-inkubation entsprochen hätte. Daß dieser Zustand noch nicht erreicht ist, bedeutet:

Der Substanzausstrom aus vorinkubierten Erythrocyten in frisches Plasma beginnt schnell (großes Konzentrationsgefälle), ist aber nach 30 noch nicht abgeschlossen.

0 ° C : Hier beginnt der Substanzübertritt aus den vorinkubierten Erythrocyten ins Plasma noch schneller : Schon nach zwei Minuten befinden sich nur noch 38 % der Substanz in den roten Blutzellen; nach fünf Minuten sind es 28 % und nach 30 Minuten würden 31 % gemessen. (Der leichte Anstieg zwischen 5 Minuten und 30 Minuten dürfte auf die Versuchungenauigkeit zurückzuführen sein.)

Auch hier ist also nach 30 Minuten Inkubation noch keine der Vergleichsinkubation ähnliche Verteilung der Substanzen zwischen den beiden Kompartimenten erreicht. (Dort befinden sich nur ca. 6 % der Substanz innerhalb der Erythrocyten.)

b) Umsatz

(s. auch Abb. 31 und Anhang, Tabellen 95 und 98)

Wie in den bisherigen Versuchen mit Plasmatausch, so ist auch hier der Amitriptylin-Anteil im Plasma (nach dem Pharmakonausstrom aus den Erythrocyten ins Plasma) sehr gering und damit der At-Anteil im Gesamtansatz (Plasma + Erythrocyten) nach der Neuverteilung der Gesamtsubstanz (Ax + At) zwischen den vorinkubierten Erythrocyten und dem frischen Plasma erheblich niedriger als innerhalb der Erythrocyten vor der Resuspension. Dies gilt sowohl für die Inkubation bei 0°C als auch für diejenige bei 37°C .

(Genauere Vergleiche der intraerythrocytären Amitriptylin-Anteile und der Gesamtumsätze vor und nach der Resuspension - wie sie bei einigen der bisherigen Experimente vorgenommen wurden - zeigen hier keine so systematischen Zusammenhänge und werden daher nicht angestellt.)

ZUSAMMENFASSUNG:

Der Pharmakonausstrom aus vorinkubierten Erythrocyten in frisches Medium ist nach 30 Minuten noch nicht ganz abgeschlossen und verläuft bei 0°C schneller als bei 37°C .

IV. EXPERIMENT MIT PLASMA - INKUBATION

21.) Amitriptylin im Plasma nach Inkubation von Vollblut bzw. Plasma mit Amitriptylin-N-Oxid.

Nachdem Inkubationen von Vollblut mit Amitriptylin gezeigt haben, daß im Plasma immer nur sehr geringe Mengen des tertiären Amins (Amitriptylin) auftreten (Versuche Nr. 12.) bis 16.)), und die Plasmatausch-Experimente Nr. 17.) bis 20.) ergaben, daß auch nach Pharmakonausstrom aus vorinkubierten Erythrocyten in frisches Plasma in diesem keine größeren Mengen von Amitriptylin gemessen werden können, mußte gefolgert werden, daß in den Erythrocyten aus dem N-Oxid entstandenes Amitriptylin die roten Blutzellen nicht verlassen kann, oder daß die großen, innerhalb der Erythrocyten gemessenen Amitriptylin-Mengen ein Laborartefakt sind, vgl. S. 17 .

Dann stellt sich aber die Frage, ob der geringe Amitriptylin-Anteil (meist 1 % bis 2 %), den man in dem die Erythrocyten umgebenden Medium findet, aus den roten Blutzellen stammt, oder ob er in diesem Medium (meist Plasma) selbst entstanden ist.

Reines Plasma kann zwar keine N-Oxid-Reduktion verursachen, aber schon bei der Entnahme des Blutes aus der Vene und vor allem während der Inkubation der Proben werden einige Erythrocyten mechanisch zerstört. Durch diese unvermeidliche Hämolyse ist das Plasma stets mit einer geringen Menge Hämoglobin verunreinigt. In den Proben ist das durch eine leichte Rotfärbung erkennbar.

Da nun Hämolysat Amitriptylin-N-Oxid zum Amitriptylin reduziert, und eine Verdünnung des Hämolysates mit Plasma diese N-Oxid-Reduktion noch steigern kann (siehe Versuche 9.2.) und 10.)), ist es denkbar, daß das wenige, im Plasma meßbare Amitriptylin in diesem selbst gebildet wird und nicht durch eine intraerythrocytäre N-Oxid-Reduktion entstanden ist.

Zur Klärung dieser Frage wurde in Versuch 21.) Vollblut 60 Minuten lang unter leichtem Schütteln inkubiert und anschließend in Erythrocyten und Plasma aufgetrennt. Dabei erfolgte bei einem Teil der Ansätze die Ax-Zugabe vor der Inkubation, beim anderen Teil wurde das N-Oxid dem Plasma nach seiner Trennung von den Erythrocyten zugefügt. Zur völligen Gleichbehandlung aller Ansätze wurde gleichzeitig mit den Ax-Zugaben den jeweils anderen Proben eine "leere Lösung" zugegeben, deren Zusammensetzung mit der Ax-Lösung identisch war, die aber kein Pharmakon enthielt. Das abgetrennte Plasma wurde dann noch einmal kurz inkubiert (die Inkubationszeit hat keinen Einfluß auf den Umsatz, vgl. Abschnitt 2.)).

Bei der Ax-Zugabe zum Plasma wurden zu Teil geringere Mengen verwendet als bei der Vollblutinkubation, um den Pharmakon-Anteil auszugleichen, der im Vollblut von den Erythrocyten aufgenommen wird.

Zum Vergleich wurde auch solches Plasma inkubiert, welches schon unmittelbar nach der Blutabnahme von den Erythrocyten abgetrennt worden war und daher nicht den Einflüssen einer Vollblut-Inkubation unterlag (keine weitere Hämolyse nach der Blutabnahme).

VERSUCHSDURCHFÜHRUNG:

je 1 ml Vollblut (Hämatokrit-Wert: 50 %)
je 5.000 ng bzw. 4.000 ng Amitriptylin-N-Oxid
Vollblut je 60 Minuten bei 37°C inkubiert
vorinkubiertes Plasma je 15 Minuten inkubiert .
Es wurden jeweils mehrfache Bestimmungen durchgeführt.

Herstellung der Ax-Stammlösung :

1 mg Ax-Dihydrat (Pulver) + 1 ml H₂O + 10 µl 1 N NaOH

Herstellung der Ax-Lösung A (Lsg.A); 5.000 ng/10 µl :

1 ml Ax-Stammlösung + 1 ml PBS-Puffer (plasmaisoton, pH 7,4)

Herstellung der Ax-Lösung B (Lsg.B); 4.000 ng/10 µl :

800 µl Lsg.A + 200 µl PBS-Puffer

Leere Lösung X (LLX); entspricht Lsg.A :

1 ml H₂O + 10 µl 1 N NaOH + 1 ml PBS-Puffer

Leere Lösung Y (LLY); entspricht Lsg.B :

800 µl LLX + 200 µl PBS-Puffer

Der genaue Versuchsablauf ist im folgendem Schema 9 dargestellt.

ERGEBNISSE:

Ergebnisse in Nanogramm, s. Anhang, Tab. 99.

Ergebnisse in Prozenten, gemeinsam für die beiden Kompartimente (Erythrocyten/Plasma) (Mittelwerte) :

ERYTHROCYTEN: At: 21 % / Ax: 8 %

PLASMA : At: 1 % / Ax: 70 %

Ergebnisse in Prozenten, nur für das Kompartiment Plasma
(die für dieses Experiment wichtigsten Ergebnisse)
siehe Tab. 27.

Tabelle 27

Prozentualer Anteil von At bzw. Ax im Plasma nach Inkubationen von 0,5 ml Plasma, das sofort nach der Blutentnahme aus der Vene von den Erythrocyten getrennt worden war, mit 5.000 ng Ax. ("A")

- 0,5 ml Plasma + 0,5 ml Erythrocyten (Vollblut) mit 5.000 ng Ax und getrennter Analyse von Erythrocyten und Plasma. ("B")

- 0,5 ml Plasma mit 5.000 bzw. 4.000 ng Ax, wobei das Plasma vor dieser Inkubation zusammen mit Erythrocyten aber ohne Pharmakon bereits den Einflüssen einer Vollblut-Inkubation ausgesetzt worden war. ("C")

Um die Inkubationen "B" und "C" genau vergleichen zu können, wurden sie zu jedem Zeitpunkt des Versuchs völlig identisch behandelt: Während bei "B" das Vollblut mit Ax inkubiert wurde, wurde es bei "C" mit LLX inkubiert; während bei "C" das Plasma mit Ax inkubiert wurde, wurde es bei "B" mit LLX bzw. LLY inkubiert.

A	0,5 ml Plasma + 5.000 ng Ax	Plasma + 10 µl LLX	At Ax	0,5 99,5	0,4 99,6	0,4 99,6	2,3 97,7	0,6 99,4	0,7 99,3	0,4	At (Mittelwert)
B	Vollblut + 5 mg Ax Inkubiert	Plasma + 10 µl LLX	At Ax	2,7 97,3	1,3 98,7	0,8 99,2	2,3 97,7	0,6 99,4	0,7 99,3	0,4	0,4
		Plasma + 10 µl LLY	At Ax	0,7 99,7	0,9 99,1	1,3 98,7	1,6 98,4	0,9 99,1	1,0 99,0	1,4 1,1	
C	Vollblut + 10 µl LLX (ohne Ax) Inkubiert	Plasma + 5 mg Ax	At Ax	1,0 99,0	0,5 99,5	0,5 99,5	0,5 99,5	0,5 99,5	0,4 99,6	0,6	0,6
		Plasma + 4 mg Ax	At Ax	0,7 99,3	0,6 99,4	0,6 99,4	0,5 99,5	0,5 99,5	0,5 99,5	0,6 0,6	

LLX = Lösung, die kein Pharmakon enthält, ansonsten aber mit der Lösung, in der 5.000 ng Ax zugegeben werden, identisch ist.

LLY = Lösung, die kein Pharmakon enthält, ansonsten aber mit der Lösung, in der 4.000 ng Ax zugegeben werden, identische ist.

Berechnung der Prozentwerte: At + Ax im Plasma = 100 %

Der Pharmakon-Anteil innerhalb der Erythrocyten beträgt 29 % (s. Anhang, Tab. 104), der Anteil des intraerythrocytär reduzierten Pharmakons 72 % (s. Anhang, Tab. 102). Beide Werte liegen im Bereich der auch bei anderen Versuchen erhaltenen Ergebnisse (vgl. Tab. 15).

Der Amitriptylin-Anteil im Plasma nach Inkubation von Vollblut mit Amitriptylin-N-Oxid erreicht mit durchschnittlich 1,2 % einen Wert, der vergleichbar gering ist, wie bei den meisten Versuchen dieser Art.

Ax-Inkubation von Plasma, das (zusammen mit Erythrocyten, aber ohne Pharmakon) vorinkubiert worden war, liefert 0,6 % Amitriptylin.

In nicht vorinkubiertem Plasma werden im Mittel 0,4 % Amitriptylin gebildet. (s. Tab. 27)

Plasma, welches nach den Belastungen einer 60-minütigen Vollblut-Inkubation von den Erythrocyten getrennt wurde, liefert also einen etwas höheren Umsatz (0,6 %), als Plasma, welches nicht vorinkubiert worden war (0,4 %). In beiden Fällen muß die Amitriptylin-Bildung auf, durch Hämolyse im Plasma vorhandenes Hämoglobin zurückgeführt werden. Dabei ist es bemerkenswert, daß die durch die Inkubation zusätzlich erzeugte Hämolyse nur einen relativ geringen Mehrumsatz verursacht.

Demgegenüber liegt der Amitriptylin-Anteil in Plasma, das gemeinsam mit Erythrocyten (als ein Kompartiment von Vollblut) mit Amitriptylin-N-Oxid inkubiert wurde, etwa doppelt so hoch (1,2 %), als in gleich behandeltem, erythrocytenfreiem Plasma (0,6 %).

Diese Umsatz-Differenz (sie beträgt hier 0,6 %) muß also durch den Ausstrom von Amitriptylin aus den Erythrocyten erklärt werden, in denen es durch N-Oxid-Reduktion entstanden ist.

Wenn bei den geringen meßbaren Amitriptylin-Mengen auch keine Angabe der genauen Höhe des im Plasma selbst entstandenen, bzw. aus den Erythrocyten stammenden Anteils möglich ist, (für eine statistische Auswertung wäre eine größere Zahl von Ansätzen notwendig), so sind die dargestellten Befunde doch ein deutlicher Hinweis auf eine Amitriptylin-N-Oxid-Reduktion in intakten Erythrocyten und die Möglichkeit, daß dieses intraerythrocytär gebildete Amitriptylin die roten Blutzellen (zumindest in geringem Ausmaß) verlassen kann.

ZUSAMMENFASSUNG:

Plasma, das gemeinsam mit Erythrocyten mit Amitriptylin-N-Oxid inkubiert wird, enthält mehr Amitriptylin, als wenn die Inkubation ohne Erythrocyten erfolgt.

D. h.: Das in Plasma vorgefundene Amitriptylin stammt zum Teil aus einer N-Oxid-Reduktion innerhalb der roten Blutzellen, aus denen es ins Plasma übergetreten ist.

D I S K U S S I O N

I. Experimente mit HämolySAT

Inkubation von Amitriptylin-N-Oxid mit menschlichem Blut, bzw. mit HämolySAT führt zur Bildung des tertiären Amins Amitriptylin.

Für diese N-Oxid-Reduktion sind Bestandteile des Erythrocyten-Cytoplasmas mit einem Molekulargewicht von mehr als 10.000 verantwortlich (V. 1.)).

Es handelt sich dabei mit größter Wahrscheinlichkeit um das Hämoglobin, das auch in chemisch reiner Form die Reaktion katalysiert (V. 1.)).

Die Reaktion ist bei 37°C und bei 0°C nach zwei Minuten abgeschlossen. Inkubationen bei diesen beiden Temperaturen führen zu gleich hohen prozentualen Umsätzen (V. 2.) u. 6.)). Auch bei pH-Veränderungen im Bereich von pH 7,4 bis pH 10,3 bleiben die Umsatzraten gleich (V. 7.)).

Diese in den untersuchten Bereichen bestehende Temperatur- und pH-Unabhängigkeit der N-Oxid-Reduktion sowie die hohe Reaktionsgeschwindigkeit sind ein deutlicher Hinweis auf eine nichtenzymatische Reaktion.

Diese Ergebnisse befinden sich in Übereinstimmung mit den Resultaten von BICKEL (3, 7), der auch den schnellen, temperaturunabhängigen Reaktionsablauf fand und ihn auf eine Katalyse durch das im Hämoglobinmolekül enthaltene Häm zurückführte (Hämokatalyse). Er konnte einen entsprechenden Umsatz auch mit Fe^{++} -Ionen erreichen.

In plasmafreiem Erythrocyten-Hämolysat werden durchschnittlich etwa 60 % des zugegebenen Amitriptylin-N-Oxids zu Amitriptylin reduziert.

Es ergeben sich aber starke interindividuelle Unterschiede zwischen dem Blut verschiedener Personen: gemessen wurden Umsätze zwischen 25 % und 90 % (V. 3.)).

Gegenüber diesen interindividuellen Schwankungen ist die Wirkung folgender Parameter, die die Höhe des Umsatzes beeinflussen können verhältnismäßig gering :

Hämolysat-Volumen: Im untersuchten Bereich (10 µl - 270 µl) gilt: Je größer das Hämolysat-Volumen ist, in dem die N-Oxid-Reduktion stattfindet, desto mehr Amitriptylin wird gebildet (zwischen 6 % und 56 %). Diese Umsatzsteigerung ist annähernd linear (V. 4.)).

N-Oxid-Menge: Bei einer wesentlichen Steigerung der eingesetzten Ax-Menge (auf das 10- bis 100fache) sinkt der prozentuale Umsatz um wenige Prozent ab (V. 5.)).

Aber auch mit den höchsten verwendeten Ax-Konzentrationen
- weit über den therapeutisch erreichten Blutspiegeln -
wurde die maximale Umsatzkapazität nicht überschritten.
Eine solche dürfte bei der klinischen Anwendung von Ax also keine Rolle spielen.

Chemisch verwandte Pharmaka: Werden dem Inkubationsansatz Substanzen hinzugefügt, die dem zu reduzierenden N-Oxid chemisch nahe verwandt sind (andere N-Oxide, deren tertiäre und sekundäre Amine) so läßt sich dadurch der Umsatz etwas verringern (ähnlich wie durch eine Steigerung der Ax-Menge). Es fand sich aber keine Abhängigkeit dieser Umsatzhemmung von der Art oder Menge der verwendeten "Hemmsubstanz" (V. 8.)).

Bemerkenswerterweise tritt diese Umsatzverminderung auch dann auf, wenn das chemisch verwandte Pharmakon erst nach Ablauf der Inkubationszeit (vor Beginn der Extraktion) dem Ansatz zugegeben wird.

Als mögliche Erklärungen für diesen Effekt kommen in Frage:

- a) eine Rückreaktion: Amitriptylin $\rightarrow$ Amitriptylin-N-Oxid.
- b) die Hemmung einer möglichen Weiterreaktion ($Ax \rightarrow At$) während der Extraktion.
- c) eine Konkurrenz bei der Extraktion.

Interessante Effekte ergeben sich bei hochgradiger Verdünnung (im Verhältnis 1:10 bzw. 1:11) des Hämolysates mit folgenden Medien :

H₂O: Verdünnung eines gleichbleibenden Hämolysat-Volumens im Verhältnis 1:10 mit Wasser vermindert den prozentualen Umsatz. (Im dargestellten Versuch von 40 % auf 20 %.) Auch hier steigt der Umsatz mit zunehmendem Hämolysat-Volumen (V. 9.1.)).

HCl (auf pH 1,5): Verdünnung von Hämolysat mit 0,1 N Salzsäure v o r der Inkubation senkt den Umsatz auf die Hälfte bis ein Drittel des Vergleichswertes (mit einem gleichen Volumen unverdünnten Hämolysates derselben Person) ab: der Umsatz wird unterdrückt.

Auch wenn die Salzsäure erst n a c h Ablauf der Inkubationszeit (vor Beginn der Extraktion) zugegeben wird findet man weniger Amitriptylin als in der Vergleichsinkubation; der Unterschied ist aber nicht so groß wie im ersten Fall. Mögliche Ursachen:

- a) Rückreaktion ($At \rightarrow Ax$).
- b) Hemmung einer möglichen Weiterreaktion ($Ax \rightarrow At$) während der Extraktion.

Bei Extraktion der HCl-verdünnten Ansätze ohne Alkalisierung ergaben sich sehr hohe (sonst nie beobachtete) Nt-Werte, die kaum unter den Amitriptylin-Werten liegen (V. 9.2.)).

NaOH (auf pH 12,7): Wird das Hämolysat v o r der Inkubation mit 0,1 N Natronlauge verdünnt und 60 Minuten inkubiert, so ergeben sich stets Umsätze von 95 % und mehr (!), auch bei Hämolysaten mit sonst sehr niedrigen Reduktionsraten.

Bei nur zweiminütiger Inkubation, oder Verdünnung n a c h Ablauf der Inkubationszeit ist dies nicht der Fall (V. 9.2.)). Dieser Unterschied läßt sich nur so erklären, daß eine Verdünnung von Hämolysat mit 0,1 N NaOH die N-Oxid-Reduktion verlangsamt - der Vergleichswert (einer 60-Minuten-Inkubation) nach zwei Minuten noch nicht erreicht ist - sie jedoch bis zu einem wesentlich höheren Grad ablaufen läßt. Plasma: Bei Verdünnung von Hämolysat mit Blut-Plasma im Verhältnis 1:11 ergibt sich stets ein Umsatz von über 90 %, und zwar unabhängig vom Zeitpunkt der Plasma-Zugabe und der Inkubationszeit. In manchen Ansätzen war überhaupt kein N-Oxid mehr nachweisbar (V. 9.2.)).

Je mehr Plasma einem konstanten, nicht zu niedrigen (im dargestellten Fall mindestens 30 µl) Hämolysat-Volumen zugegeben wird, desto höher wird die Reduktionsrate, bis sie auf 100 % ansteigt (V. 10.)). Geht die Verdünnung gegen Unendlich, so sinkt der Umsatz wieder auf 0 %, wie es bei dem dann vorliegenden reinen Plasma zu erwarten ist (V. 11.)).

Bei konstanten Plasma-Volumen läßt sich der Umsatz in einem Hämolysat-Plasma-Gemisch durch Vergrößerung des Hämolysat-Volumens steigern (V. 10.)).

II. Experimente mit intakten Erythrocyten

Substanzverteilung:

Nach Zugabe von Amitriptylin-N-Oxid zu Vollblut verteilt sich das Pharmakon zwischen den beiden Kompartimenten Plasma und Erythrocyten.

Innerhalb der roten Blutzellen werden durchschnittlich etwa 20 % der meßbaren Gesamtsubstanz (Ax + gebildetes At) im Cytoplasma der Erythrocyten wiedergefunden.

Diese sind nicht membranengebunden, wie sich zeigen läßt, wenn man mit Ax inkubierte Erythrocyten hämolysiert und 15 Minuten lang bei 20°C mit 20.000 G zentrifugiert.

Die restlichen (im Mittel) 80 % der Gesamtsubstanz befinden sich im Plasma (vgl. Tab. 15).

Amitriptylin-N-Oxid wird also von Plasma wesentlich stärker gebunden als von den Erythrocyten.

Dieser intraerythrocytäre Pharmakonanteil von durchschnittlich 20 % schwankt interindividuell zwischen 10 % und 25 %. Er kann durch Änderung von Art oder Menge des die Erythrocyten umgebenden Mediums verändert werden :

Zunahme der Plasma-Volumens bei gleichbleibender Erythrocyten-Menge (Senkung des Hämatokrit-Wertes) vermindert den Substanzanteil, der von den roten Blutzellen aufgenommen wird, weil mehr Pharmakon im Plasma gebunden bleibt.

Umgekehrt führt eine Abnahme des Plasma-Volumens (Steigerung des HK-Wertes) zu einer Zunahme des intraerythrocytären Pharmakonanteils (V. 18.)).

Auch bei Verminderung der Proteinkonzentration im Plasma (bei konstantem Volumen) - Ersatz des Plasmas durch ein Plasma-PBS-Puffer-Gemisch - und damit seiner Proteinbindungskapazität nimmt der intraerythrocytäre Substanz-

anteil zu, bis bei einer Suspension von roten Blutzellen in proteinfreiem PBS-Puffer (plasmaisoton, pH 7,4) - entsprechend einem HK-Wert von 50 % - sich in Erythrocyten und Medium etwa gleich viel Pharmakon nachweisen läßt (V. 13.), 14.), 15.)).

Der Erythrocyten-Inhalt ist also nicht in der Lage, das Medikament zu binden, sonst müßte bei einer Suspension von Erythrocyten in Puffer der überwiegende Teil des Pharmakons innerhalb der Erythrocyten zu finden sein.

Der Verteilungsvorgang des Ax zwischen Plasma und Erythrocyten ist bei einer Temperatur von 37°C nach ca. drei Minuten abgeschlossen, während er bei 0°C eine längere Zeit benötigt (V. 16.)).

Diese schnell erreichte Verteilung bleibt mindestens 22 Stunden lang ohne große Veränderungen erhalten (V. 15.)).

Ax-Reduktion:

Innerhalb der Erythrocyten liegen im Mittel etwa 50 % des Pharmakons in der reduzierten Form als Amitriptylin vor. Dieser Wert schwankt interindividuell jedoch außerordentlich stark: zwischen 10 % und 95 % .

Im Plasma dagegen, wo das Auftreten von Amitriptylin für die systemische Wirkung und den Metabolismus besonders von Bedeutung wäre, findet man nur sehr geringe Mengen des tertiären Amins: 0 % bis 4 % (vgl. Tab. 15).

Auch nach langer Inkubationszeit (bis 22 Stunden wurden beobachtet) ändert sich daran nichts.

Das ist um so bemerkenswerter, als exogen zugegebenes At überwiegend (zu ca. 70 %) im Plasma verbleibt (V. 15.)).

Diesen Ergebnissen entsprechen in-vivo-Messungen bei Probanden, die zeigten, daß sich nach Ax-Gabe innerhalb der Erythrocyten mehr Amitriptylin - und weniger N-Oxid - befindet als im Plasma (13), während es bei Amitriptylin-Gabe umgekehrt ist.

Für Imipramin-N-Oxid und Imipramin wurden analoge Befunde beschrieben (20).

Über die Verteilung der Pharmaka zwischen Plasma und Erythrocyten kann man also sagen :

Der intraerythrocytär meßbare Substanzanteil ist bei Amitriptylin-N-Oxid (bzw. bei der Gesamtsubstanz: Ax + At) mit ca. 20 % geringer als bei exogen zugegebenem At mit ca. 30 %, bei diesem aber noch erheblich niedriger als bei endogen aus Ax gebildetem Amitriptylin, von dem ca. 90 % innerhalb der roten Blutzellen gefunden werden (V. 15.)).

Es scheint, als könne in den Erythrocyten entstandenes Amitriptylin diese nicht verlassen.

III. Experimente mit Pharmakontransport aus den Erythrocyten in das umgebende Medium

Werden vorinkubierte Erythrocyten (die bereits Ax und At enthalten) ein zweites Mal, mit frischem Plasma (welches kein Pharmakon enthält) inkubiert, so tritt, entlang dem Konzentrationsgefälle, Pharmakon aus den roten Blutzellen in dieses frische Plasma über.

Dieser Substanzausstrom aus den Erythrocyten ist nach 30 Minuten noch nicht ganz abgeschlossen (V. 20.)).

Damit beansprucht er deutlich mehr Zeit als die Ax-Aufnahme in die roten Blutzellen (3 Minuten; vgl. V. 16.)).

Dennoch kann man wohl davon ausgehen, daß unter in-vivo-Bedingungen ein freier Austausch zwischen Plasma-Ax und intraerythrocytärer Gesamtsubstanz (Ax + At meßbar) besteht, denn die Plasmaspiegel der Pharmaka verändern sich nach therapeutischer Gabe im Bereich von Stunden. Damit dürfte genügend Zeit für den Auswärtstransport aus den Erythrocyten ins Plasma - wo die Pharmakonzentration aufgrund der renalen und hepatischen Elimination allmählich absinkt - zur Verfügung stehen.

Es gelang auch mit diesen Experimenten nicht, einen Übertritt von Amitriptylin aus den Erythrocyten ins Plasma zu erreichen :

Zwar strömt soviel Pharmakon (Gesamtsubstanz) aus den "beladenen" Erythrocyten in das "leere" Medium aus, bis eine - auch bei einer vergleichbaren Inkubation, mit der üblichen Ax-Zugabe zum Plasma, zu erwartende - Verteilung von ca. 20 % Gesamtsubstanz in den Erythrocyten und ca. 80 % Gesamtsubstanz im Plasma, erreicht ist; doch nach einem solchen Pharmakontransport aus den Erythrocyten ins Plasma

ist in diesem Plasma wiederum nur sehr wenig Amitriptylin (meist um 1 %) nachzuweisen (V. 17.) - 20.)).

Innerhalb der roten Blutzellen ist - gegenüber der Vorinkubation - meist ein geringfügiger Anstieg des Amitriptylin-Anteils festzustellen. Dieser entspricht aber bei weitem nicht der At-Menge, die vor der Resuspension der vorinkubierten Erythrocyten in diesen gemessen werden konnte.

Also hat die vor der Resuspension (in frischem Plasma oder Puffer) innerhalb der vorinkubierten Erythrocyten meßbare Amitriptylin-Menge nach der Neuverteilung der Pharmaka deutlich abgenommen und die Amitriptylin-N-Oxid-Menge in entsprechendem Maße zugenommen.

Man kann also von einem Verteilungsgleichgewicht (der Gesamsubstanz, zwischen Erythrocyten und Plasma) und von einem weitgehenden Umsatzgleichgewicht (zwischen Ax und At, sowohl in den Erythrocyten als auch im Plasma) sprechen, welche sich einstellen, unabhängig davon, ob das Pharmakon dem Vollblut von außen zugegeben wird, oder ob es sich aus vorinkubierten Erythrocyten heraus, zwischen diesen und dem frischen Plasma, neu verteilt.

Zur Erklärung dieses Phänomens muß man entweder

- a) postulieren, daß beim Verlassen der Erythrocyten ein Großteil des (zuvor aus Ax entstandenen) Amitriptylins wieder zum N-Oxid oxidiert wird, oder
- b) annehmen, daß die N-Oxid-Reduktion erst nach der Trennung der Erythrocyten vom Plasma auftritt, wenn das Hämoglobin bei der Extraktion denaturiert wird, daß die At-Entstehung also ein Laborartefakt ist (vgl. 21).

Immer wenn sich das Pharmakon im Plasma befindet, liegt es
fast ausschließlich als N-Oxid vor.

Dies ist das wichtigste Ergebnis der vorliegenden Arbeit,
denn das bedeutet :

In Erythrocyten nach Kontakt mit Amitriptylin-N-Oxid meß-
bares Amitriptylin erscheint nie in nennenswertem Ausmaß
im Plasma.

Damit ist eine N-Oxid-Reduktion in zirkulierenden Erythro-
cyten für den Metabolismus und vor allem für den Wirkungs-
mechanismus und die therapeutische Wirksamkeit von
Amitriptylin-N-Oxid ohne Bedeutung.

Das in vivo nach Applikation von Ax im Plasma und vor
allem im Gehirn (16) nachweisbare At stammt nicht aus
einer N-Oxid-Reduktion in Erythrocyten. Für seine Ent-
stehung sind andere Gewebe verantwortlich zu machen.

IV.

Experiment mit Plasma-Inkubation

Das Plasma eines mit Ax inkubierten Vollblutes enthält mehr At als Plasma, welches den Belastungen einer identischen Vollblut-Inkubation (Hämolyse) in Abwesenheit eines Pharmakons ausgesetzt wurde und dem erst nach seiner Trennung von den Erythrocyten Ax beigemischt wird. (Im dargestellten V. 21.) wurden durchschnittlich 1,2 % gegenüber 0,6 % gemessen.)

Das wenige, im Plasma einer Vollblut-Inkubation meßbare Amitriptylin stammt also zum Teil (etwa zur Hälfte) aus einer Ax-Reduktion in dem - durch Hämolyse mit Hämoglobin verunreinigtem - Plasma, zum anderen Teil aber aus einer N-Oxid-Reduktion innerhalb der intakten Erythrocyten, aus denen es ins Plasma übergetreten ist.

Für den Gesamtmetabolismus des Amitriptylin-N-Oxids spielt dieses wenige Amitriptylin, das aus den Erythrocyten ins Plasma übergehen kann aber keine Rolle, da es mengenmäßig vernachlässigbar ist und außerdem plasmatisches At eine erheblich längere Halbwertszeit (ca. 24 Stunden) hat als plasmatisches Ax (ca. 2 Stunden) (13).

Die Entstehung des meßbaren Amitriptylins

Wie bereits mehrmals erwähnt (s. S. 17, 213) beschrieben POWIS und DeGRAW (21) - am Beispiel von Indicin-N-Oxid - daß die Reduktion eines N-Oxids zum tertiären Amin durch Hämoglobin erst dann erfolgt, wenn das Hämoglobin bei der Extraktion der Proben (nach Ende der Inkubation, vor der Analyse im HPLC) durch ein organisches Lösungsmittel denaturiert wird. In diesem Fall würde das nach Amitriptylin-N-Oxid-Inkubation in Blut nachweisbare Amitriptylin also einen Laborartefakt darstellen.

Für die wesentlichste Aussage dieser Arbeit - daß eine Ax-Reduktion in Erythrocyten für die Pharmakokinetik des Medikamentes bedeutungslos ist, weil das Reduktionsprodukt Amitriptylin praktisch nicht im Plasma erscheint - spielt es zwar keine Rolle, ob innerhalb zirkulierender roter Blutzellen größere Mengen von At vorliegen, die beim Verlassen der Erythrocyten wieder zum N-Oxid oxidiert werden, oder ob erst gar kein At entsteht; dennoch ist es von theoretischem Interesse, welche der beiden Möglichkeiten zutrifft, und die Versuchsergebnisse sollen daraufhin betrachtet werden.

(Der Versuch, die nachzuweisenden Pharmaka - vor der Extraktion mit Dichlormethan - durch eine Ultrafiltration mit einer Trennung beim Molekulargewicht 25.000 vom Hämoglobin zu trennen, scheiterte aus technischen Gründen an der extrem hohen Viskosität von plasmafreiem Erythrocyten-Hämolysat.)

Argumente gegen eine N-Oxid-Reduktion in intakten,
zirkulierenden Erythrocyten (für die "Artefakt-Theorie") :

Die folgenden Befunde finden in der "Artefakt-Theorie"
eine einfache Erklärung:

a) Zugabe chemisch verwandter Pharmaka verringert die Reduktionsrate von N-Oxiden, sowohl wenn sie *in vitro*, als auch wenn sie *in vivo* nach der Inkubationszeit erfolgt: Der beobachtete Effekt tritt also nach der Inkubationszeit auf (V. 8.)).

b) Nach Ax-Inkubation *in vitro* oder Ax-Applikation *in vivo* wird ein hohes Konzentrationsgefälle zwischen intraerythrocytärem und plasmatischem Amitriptylin gemessen. Ginge man von einer N-Oxid-Reduktion in intakten Erythrocyten aus, so müßte man aufgrund der völlig anderen Verteilung annehmen, daß endogen (aus dem N-Oxid gebildetes) At und exogen zugeführtes At in den roten Blutzellen sehr verschieden lokalisiert und gebunden sind (vgl. S. 211).

c) Die in vorinkubierten Erythrocyten meßbare Amitriptylin-Menge nimmt nach Resuspension der Erythrocyten in frischem Plasma ab.

Bei Annahme einer N-Oxid-Reduktion in intakten Erythrocyten müßte ein Rückumsatz ($At \rightarrow Ax$) postuliert werden (vgl. S. 156), der beim Austritt der Pharmaka aus den Erythrocyten ins Plasma stattfindet. Eine solche Oxidation von tertiären Amin zum N-Oxid findet bei Inkubation von Amitriptylin mit Blut oder Hämolyssat aber nicht statt.

Auch hier müßte also eine unterschiedliche Lokalisation
- verbunden mit einer unterschiedlichen Bereitschaft
zur Oxidation - von endogenem und exogenem Amitriptylin
vorausgesetzt werden.

d) KUSS (13) zeigte in einer Probandenstudie, daß nach
Ax-Applikation das intraerythrocytär meßbare Amitriptylin
eine dem plasmatischen N-Oxid vergleichbare Halbwertszeit
- von etwa 2 Stunden - hat, während exogen gegebenes
Amitriptylin eine wesentlich längere Halbwertszeit besitzt
- etwa 24 Stunden ; und auch NAGY (20) fand bei in-vivo-
Versuchen mit dem nahe verwandten Antidepressivum Imipra-
min-N-Oxid eine weitgehende Parallelität der Konzentrations-
Zeit-Kurven für das plasmatische N-Oxid und das intraery-
throcytäre tertiäre Amin.

In der "Artefakt-Theorie" sind diese Befunde selbsterstän-
dlich, da nach ihr das plasmatische N-Oxid und das intra-
erythrocytär als tertiäres Amin gemessene Pharamkon
chemisch identisch sind. Mit der Vorstellung einer N-Oxid-
Reduktion in zirkulierenden Erythrocyten sind diese Ergeb-
nisse dagegen nicht ohne erklärende Hypothesen vereinbar.

Argumente für eine N-Oxid-Reduktion in intakten,
zirkulierenden Erythrocyten :-----

a) Trotz des starken Amitriptylin-Gefälles zwischen
Erythrocyten und Plasma ist im Plasma doch meist eine
bestimmte (wenn auch geringe) At-Menge nachzuweisen. Dieses
At entsteht zwar zum Teil in dem - durch Hämolyse mit
Hämoglobin verunreinigtem - Plasma selbst, zum Teil
stammt es aber aus den Erythrocyten, in denen es folglich
durch N-Oxid-Reduktion entstanden sein muß (V. 21.)).

b) Nach dem Ausstrom der Pharmaka aus vorinkubierten Erythrocyten in frisches Medium liegt innerhalb der roten Blutzellen ein etwas höherer Anteil als tertiäres Amin vor, als in einer Vergleichsinkubation mit nicht vorinkubierten Erythrocyten (und als in den Erythrocyten der Vorinkubation selbst). Dieser meist eindeutig nachweisbare Anstieg der relativen intraerythrocytären At-Konzentration entspricht zwar bei weitem nicht dem vor der Resuspension vorinkubierter Erythrocyten in diesen meßbaren At-Menge ; bei einer Ax-Reduktion erst während der Extraktion dürfte sich aber überhaupt kein Unterschied ergeben, denn bei der Extraktion liegen die gleichen Mengen von Hämolysat, N-Oxid und Dichlormethan vor, unabhängig davon, ob das Ax zuvor aus dem Plasma in die Erythrocyten übergetreten war oder umgekehrt. (V. 18.)/19.)).

c) In Versuch 9.2.) wurden drei verschiedene Hämolysate jeweils v o r und n a c h der Inkubation im Verhältnis 1:11 (unter anderem) mit 0,1 N HCl verdünnt (pH 1,5). Bei Verdünnung n a c h der Inkubation (vor Beginn der Extraktion) ergab sich stets ein fast doppelt so hoher Umsatz als in den Ansätzen, die schon v o r der Inkubation verdünnt wurden (s. Tab. 12 und Abb. 7). Da die Ansätze bei der Extraktion (Zugabe des organischen Lösungsmittels) identische Mengen von Hämolysat, Salzsäure und Dichlormethan enthielten, muß der in den zunächst unverdünnten Proben gemessene höhere At-Anteil während der Inkubation entstanden sein, zu einer Zeit also, da daß Hämolysat noch mit keinem denaturierenden Agens Kontakt hatte. Damit ist zumindest der Unterschied zwischen "Verdünnung vor" und "Verdünnung nach der Inkubation" auf eine N-Oxid-Reduktion in nativem Hämoglobin zurückzuführen.

Aus dieser Gegenüberstellung kann man folgern :

Die in Hämolysat, bzw. in Erythrocyten meßbare Reduktion des Amitriptylin-N-Oxids zum Amitriptylin ist zu einem wesentlichen Teil ein Laborartefakt, der nach Denaturierung des Hämoglobins auftritt.

Innerhalb zirkulierender Erythrocyten wird nur ein kleiner Teil des N-Oxids (um 1 %) zum tertiären Amin reduziert. Dieser tatsächliche Umsatz ist aber mengenmäßig und wegen der längeren Halbwertszeit des At (13) für den Gesamtmetabolismus des Pharmakons ohne Bedeutung.

Konsequenzen für die klinisch-chemische Bestimmung von
Amitriptylin-N-Oxid und seinen Metaboliten in Blut

Anwesenheit von Hämoglobin bei der Extraktion von Amitriptylin-N-Oxid mit Hilfe eines organischen Lösungsmittels führt zu einer artefiziellen Reduktion eines großen Teils des Pharmakons zum tertiären Amin Amitriptylin und verfälscht damit die Meßergebnisse.

Bei N-Oxid-Messungen in Plasma oder Serum muß daher sorgfältig darauf geachtet werden, daß in der Probe möglichst keine Hämolyse stattfindet:

Erythrocyten-schonende Blutabnahme mit dicken Kanülen, Blut abtropfen lassen, nicht saugen; sofortige, sorgfältige Trennung von Erythrocyten und Plasma durch Zentrifugation.

Auch empfiehlt es sich, Metabolitenbestimmungen nach Ax-Gabe erst dann vorzunehmen, wenn ein Großteil des Pharmakons schon nicht mehr als N-Oxid vorliegt, sonst täuscht eine N-Oxid-Reduktion in vitro einen zu hohen At-Gehalt der Probe vor. (Eine geringfügige Hämolyse läßt sich nie ganz ausschließen.)

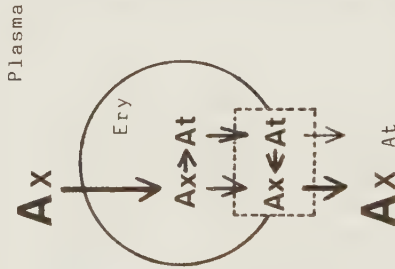
Da Hämoglobin den Hauptbestandteil der roten Blutzellen ausmacht, führen Ax-Messungen in Erythrocyten sicher zu keinen klinisch verwertbaren Ergebnissen, wenn organische Lösungsmittel zum Einsatz kommen.

(Und selbst wenn die N-Oxid-Reduktion nicht vor allem ein Laborartefakt wäre, ließe sich aus den Werten innerhalb der Erythrocyten kein Rückschluß auf die Metabolitenlage außerhalb derselben ziehen.)

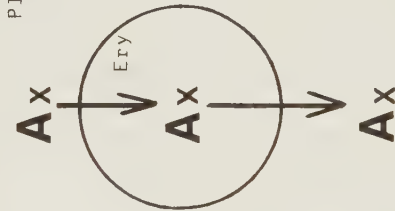
Es ist anzunehmen, daß diese Aussagen auch für andere pharmakologisch eingesetzte N-Oxide gelten.

INKUBATION VON VOLLBLUT MIT AX

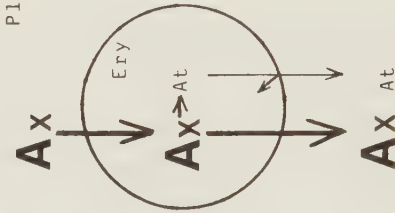
THEORIE:
N-Oxid-Reduktion innerhalb
zirkulierender Erythrocyten



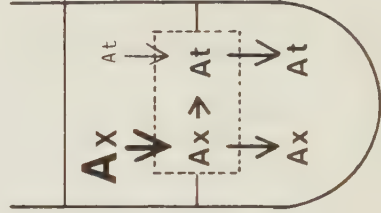
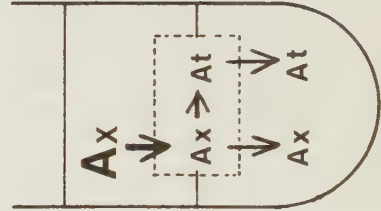
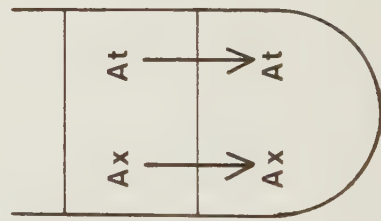
THEORIE:
Die N-Oxid-Reduktion ist
ein Laborartefakt



TATSÄCHLICHE VORGÄNGE:
geringer Umsatz in Erythro-
cyten + Laborartefakt



EXTRAKTION DER HÄMOLYSIERTEN
ERYTHROCYTEN



Dichlormethan-
Phase
Hämolysat-
Phase

Abb. 32 (vorstehend)

Schematische Darstellung der beiden gegensätzlichen Theorien der N-Oxid-Reduktion durch Hämoglobin

- N-Oxid-Reduktion in zirkulierenden Erythrocyten durch natives Hämoglobin
- Laborartefakt: N-Oxid-Reduktion in vitro nach Denaturierung des Hämoglobin-Moleküls und der tatsächlichen Verhältnisse, wie sie nach den Resultaten der vorliegenden Arbeit am wahrscheinlichsten sind
- Geringe N-Oxid-Reduktion durch natives Hämoglobin (um 1 %), der größte Teil des meßbaren tertiären Amins (At nach Inkubation von Ax) entsteht aber in vitro nach Hämoglobin-Denaturierung.

In der Abbildung bedeuten:

Senkrechte Pfeile ($\downarrow$): Richtung des Pharmakonstroms

Waagrechte Pfeile ($\longrightarrow$): Chemische Umwandlungen

Die relativen Mengen der Pharmaka sind grob durch die Größe des Schriftzuges, bzw. die Größe der Pfeile symbolisiert.

Eigenschaften des Laborartefaktes

Der Laborartefakt N-Oxid-Reduktion tritt mit größter Wahrscheinlichkeit während der Extraktion der Pharmaka aus den Inkubationsansätzen auf, also nach der Denaturierung des Hämoglobins durch das organische Lösungsmittel Dichlormethan (bei den Experimenten dieser Arbeit) (vgl. 21).

Die Reduktion erfolgt dann offenbar sehr schnell, denn in einem (nicht genauer beschriebenen) Versuch zeigte sich keine Abhängigkeit der gebildeten Amitriptylin-Menge von der Dauer des Ausschüttelns:

Ausschüttelzeiten zwischen 5 Minuten und 30 Minuten.

In den oben dargestellten Versuchen wurde jeweils ca. 15 Minuten ausgeschüttelt.

An dieser Stelle lohnt ein Blick auf Versuch 9.2.) : Verdünnung von Hämolysat mit 0,1 N NaOH im Verhältnis 1:11 (pH 12,7) führt zu einer fast 100 %-igen Ax-Reduktion, wenn die Verdünnung v o r Inkubationsbeginn erfolgt. Dieser ungewöhnlich hohe Umsatz muß auf eine Reaktion während der Inkubationszeit (in Abwesenheit eines organischen Lösungsmittels) zurückgeführt werden, denn die gleiche Verdünnung n a c h Ablauf der Inkubationszeit (vor Extraktionsbeginn) liefert erheblich niedrigere Amitriptylin-Werte (s. Tab. 12 und Abb. 7).

(Das bedeutet auch, daß in diesem Fall die Reaktion relativ langsam abläuft, weil die wenigen Minuten zwischen Verdünnung und Extraktion zum Erreichen des Vergleichswertes nicht genügen.)

Für die Katalyse der N-Oxid-Reduktion ist es also nicht erforderlich, daß das Hämoglobin durch ein organisches Lösungsmittel denaturiert wird. Denaturierung durch Natronlauge hat den gleichen Effekt.

Wenn es nun aber so unspezifische Einflüsse sind, wie eine Denaturierung durch ein organisches Lösungsmittel oder durch Natronlauge, die das Hämoglobin-Molekül in die Lage versetzen, N-Oxide zu reduzieren - möglicherweise durch ein Herauslösen der Häm-Gruppe aus ihrer geschützten Lage innerhalb des Hämoglobin-Moleküls - so läßt sich nicht ausschließen, daß Entsprechendes auch im menschlichen Körper geschehen kann.

Es wäre zum Beispiel denkbar, daß das Hämoglobin-Molekül (bzw. die Häm-Gruppe) während des Erythrocyten-Abbaus in der Milz, oder des Hämoglobin-Abbaus in der Leber, bei der Resorption eines Hämatoms, oder im Verlauf des Porphyrin-Stoffwechsels (Häm-Synthese / Häm-Abbau) Einflüssen unterworfen ist, welche es in einen Zustand versetzen, der demjenigen nach Denaturierung des Hämoglobin-Moleküls *in vitro* soweit ähnelt, daß auch *in vivo* eine Katalyse der N-Oxid-Reduktion erfolgen kann.

In diesem Fall wäre zwar nicht das Blut als solches, als flüssiges Organ, wären nicht die zirkulierenden Erythrocyten für die Reduktion von Amitriptylin-N-Oxid mitverantwortlich, wohl aber der Hauptbestandteil der roten Blutzellen, das Hämoglobin - bzw. dessen Häm-Gruppe - in irgendeiner Phase ihrer außer-erythrocytären Existenz.

Z U S A M M E N F A S S U N G

Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Untersuchungen befassen sich mit der Reduktion von Ax zu At.

Es sollte geklärt werden, ob eine solche N-Oxid-Reduktion im Organismus durch Hämoglobin katalysiert wird, wie es BICKEL (3) nach Experimenten mit Imipramin-N-Oxid gefolgert hat, oder ob das tertiäre Amin At durch einen Laborartefakt bei der Extraktion mit organischen Lösungsmitteln entsteht, wie es POWIS und DeGRAW (19) für die Indizin-N-Oxid-Reduktion beschrieben haben.

Dazu wurde Blut gesunder Versuchspersonen als Hämolysat oder Vollblut unter verschiedenen Versuchsbedingungen mit Ax inkubiert.

Zur Extraktion diente als organisches Lösungsmittel Dichlormethan, mit dem die besten Ergebnisse erzielt wurden.

Aufgetrennt und nachgewiesen wurden die beiden Substanzen mittels Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie und UV-Detektion.

Nach Inkubationen von Ax mit plasmafreiem Erythrocyten-Hämolysat kann im Ansatz At nachgewiesen werden. Diese Reduktion findet auch bei Inkubationen mit Hämoglobin allein statt.

Nach der (kürzest möglichen) Inkubationszeit von zwei Minuten ist kein At-Anstieg mehr zu verzeichnen.

Eine Temperatur- oder pH-Abhängigkeit der Reaktion konnte nicht nachgewiesen werden.

Im Einklang mit bisherigen Arbeiten spricht das für eine nicht-enzymatische Reaktion.

Durchschnittlich werden im Erythrocyten-Hämolysat etwa 60 % des Ax zu At reduziert, wenn 60 Minuten bei 37°C inkubiert wird.

Bei entsprechenden Versuchen mit Vollblut werden im Mittel 20 % des Ax von den Erythrocyten aufgenommen. Ersetzt man das die Erythrocyten umgebende Plasma durch ein gleiches Volumen isotonen Phosphat-Puffers (pH 7,4) so steigt der intraerythrocytäre Ax-Anteil auf ca. 50 % an. Daraus kann man schließen, daß der Erythrocyten-Inhalt nicht wie Plasma in der Lage ist, Ax zu binden.

Im Plasma treten - im Gegensatz zu den Erythrocyten - nur sehr geringe Mengen At auf.

Durchschnittlich 90 % des nach Ax-Inkubationen in Vollblut insgesamt meßbaren At finden sich innerhalb der Erythrocyten wieder. Von exogen zugegebenem At werden dagegen nur etwa 30 % in die roten Blutzellen aufgenommen.

Diese Ergebnisse sind sowohl mit einer N-Oxid-Reduktion durch natives Hämoglobin als auch mit einem Laborartefakt vereinbar.

Zur Unterscheidung zwischen beiden Prozessen wurden mit Ax vorinkubierte Erythrocyten in pharmakonfreiem Plasma resuspendiert und nach einer erneuten Inkubation die Konzentrationen von Ax und At in den roten Blutzellen und im Plasma gemessen.

Bei diesen Versuchen kommt es zu einer Abnahme des zuvor im Ansatz insgesamt meßbaren At und zu einer entsprechenden Ax-Zunahme.

Demgegenüber ist aber nach einer Inkubation von Vollblut mit At - erwartungsgemäß - keine Ax-Entstehung zu verzeichnen.

Aus dieser Diskrepanz muß geschlossen werden, daß die beobachtete Reduktion von A_x zu A_t ein Laborartefakt ist, der erst bei der Extraktion der Ansätze auftritt, wenn das darin enthaltene Hämoglobin beim Kontakt mit einem organischen Lösungsmittel denaturiert wird.

Die hier vorgestellten Versuche, die weit über die Experimente von Bickel hinausgehen, lassen sich nur mit einem Laborartefakt, entsprechend den Ergebnissen von POWIS und DeGRAW in Einklang bringen.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. BICKEL, M.H.: Liver metabolic reactions: Tertiary amine N-dealkylation, tertiary amine N-oxidation, N-oxide reduction, and N-oxide N-dealkylation. I. Tricyclic tertiary amine drugs. Arch. Biochem. Biophys. 148 (1972) 54-62.
2. BICKEL, M.H.: N-oxide formation and related reactions in drug metabolism. Xenobiotica 1 (1971) 313-319.
3. BICKEL, M.H.: The pharmacology and biochemistry of N-oxides. Pharmakol. Rev. 21 (1969) 325-355.
4. BICKEL, M.H., GIGON, P.L.: Metabolic interconversions and binding of imipramine, imipramine-N-oxide, and desmethylimipramine in rat liver slices. Xenobiotica 1 (1971) 631-641.
5. BICKEL, M.H., WEDER, H.J.: The total fate of a drug: Kinetics of distribution, excretion, and formation of 14 metabolites in rats treated with imipramine. Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. 173 (1968a) 433-463.
6. BICKEL, M.H., WEDER, H.J.: Buccal absorption and other properties of pharmacokinetic importance of imipramine and its metabolites. J. Pharm. Pharmacol. 21 (1969) 160-168.

7. BICKEL, M.H., WEDER, H.J., AEBI, H.: Metabolic inter-conversions between imipramine, its N-oxide, and its desmethyl derivative in rat tissues in vitro. Biochem. biophys. Res. Commun. 33 (1968) 1012-1218.
8. BREYER-PFAFF, U., EWERT, M., WIATR, R.: Comparative single-dose kinetics of amitriptyline and its N-oxid in a volunteer. Arzneim.-Forsch./Drug Res. 28 (II) (1978) 1916-1920.
9. CARLSSON, A., LINDQUIST, M.: Effects of antidepressant agents on monoamine synthesis. In: GARATTINI, S. (ed.) Depressive Disorders. Stuttgart, Schattauer (1978) .
10. JUNGKUNZ, G., KUSS, H.J.: On the relationship of nortriptyline : amitriptyline ratio to clinical improvement of amitriptyline treated depressive patients. Pharmakopsychiat. 13 (1980) 111-116.
11. KANIG, K., TULUWEIT, K.: Synopsis of results of clinical trials with amitriptylinoxide. Arzneim.-Forsch./Drug Res. 28 (II) (1978) 1920-1923.
12. KUSS, H.J.: unveröffentlicht .
13. KUSS, H.J., JUNGKUNZ, G., JOHANNES, K.J.: Metabolism of amitriptyline and amitriptyline-N-oxide in humans - a kinetic study. unveröffentlicht .
14. KUSS, H.J., NATHMANN, M.: Quantitative Bestimmung tricyclischer Antidepressiva mit der Hochdruck-flüssigkeitschromatographie. Arzneim.-Forsch./Drug Res. 28 (1978) 1301 .

15. MAJ, J., VETULANI, J., MICHALUK, J., ROGOZ, Z., SKUZA, G.:
Central action of amitriptyline N-oxide. *Pharmacopsychiat.*
15 (1982) 187-191.
16. MELZACKA, M., DANEK, L.: Pharmacokinetics of amitriptyline
N-oxide in rats after single and prolonged oral
administration. *Pharmacopsychiat.* 16 (1983) 30-34.
17. MIDGLEY, R., HAWKINS, D.R., CHASSEAUD, L.F.: The
metabolic fate of the antidepressive agent amitrip-
tylinoxide in man. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 28 (II)
(1978) 1911-1916.
18. MINDER, R., SCHNETZER, F., BICKEL, M.H.: Hepatic and
extrahepatic metabolism of the psychotropic drugs
chlorpromazine, imipramine, and imipramine-N-oxide.
Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 268 (1971)
334-347.
19. NAGY, A.: The kinetics of imipramine-N-oxide in rats.
Acta pharmacol. et toxicol. 42 (1978) 68-72.
20. NAGY, A., HANSEN, T.: The kinetics of imipramine-N-oxide
in man. *Acta pharmacol. et toxicol.* 42 (1978) 58-67.
21. POWIS, G., DeGRAW, C.L.: N-oxide reduction by hemoglobin,
cytochrome C and ferrous ions. *Res. Commun. chem.*
Phathol. Pharmacol. 30 (1980) 143-150.
22. RAPP, W., NOREN, B., PEDERSEN, F.: Comparative trial of
imipramine-N-oxide and imipramine in the treatment of
out-patients with depressive syndroms. *Acta psychiat.*
scand. 49 (1973) 77-90.
23. SANTAGOSTINO, G., FACINO, R.M., PIRILLO, D.: Urinary
excretion of amitriptyline N-oxide in humans.
J. Pharm. Sci. 63 (1974) 1690-1692.

.

A N H A N G

Die Tabellen dieses Anhangs enthalten die gemessenen Nanogrammwerte der analysierten Pharmaka bei den einzelnen Versuchen, sowie die daraus errechneten Prozentanteile. Sie zeigen bei jedem Experiment den Weg von den Meßwerten zu - im Hauptteil dieser Arbeit besprochenen - Prozentwerten.

Bei den Angaben handelt es sich grundsätzlich um Einzelmessungen, Mittelwerte sind als solche gekennzeichnet.

Die Überschriften bzw. Legenden der Tabellen sind hier nicht so ausführlich, wie im Hauptteil.

Die genauen Versuchsbedingungen der einzelnen Experimente sind im Hauptteil der Arbeit bei dem Versuch angegeben, zu dem die im Anhang zusammengestellten Tabellen gehören.

Die verschiedenen, in den Tabellen angegebenen Prozentwerte errechnen sich aus den Nanogrammwerten wie folgt :

(Anggegeben ist immer der unterstrichene Anteil)

Wenn H ä m o l y s a t inkubiert wurde:

$$\underline{Ax} + \underline{At} \text{ in diesem HämolySAT} = 100 \%$$

Wenn intakte E r y t h r o c y t e n inkubiert wurden:

"Prozentualer Anteil einzeln für jedes Kompartiment":

$$\text{Für die Erythrocyten : } \underline{Ax} + \underline{At} = 100 \%$$

$$\text{Für das Plasma : } \underline{Ax} + \underline{At} = 100 \%$$

"Prozentualer Anteil gemeinsam für Erythrocyten und Plasma":

$$\underline{Ax \text{ in Erys}} + \underline{At \text{ in Erys}} + \underline{Ax \text{ im Plasma}} + \underline{At \text{ im Plasma}} = 100 \%$$

"Substanzverteilung":

$$(Ax + At) \text{ in den } \underline{\text{Erythrocyten}} + (Ax + At) \text{ im } \underline{\text{Plasma}} = 100 \%$$

"Gesamtumsatz"

$$\underline{Ax} (\text{in Erys} + \text{Plasma}) + \underline{At} (\text{in Erys} + \text{Plasma}) = 100 \%$$

Ergebnis-Tabellen zu :

A.) Antikoagulation mit Heparin oder EDTA

2000 ng N-Oxid	Inkuba- tions- zeit	Analyse	E D T A 500 µl Hämolysat	Heparin 500 µl Hämolysat
AX	10 min.	At	194	233
		Ax	586	782
	90 min.	At	189	230
		Ax	608	750
IX	10 min.	Im	125	122
		Ix	938	915
	90 min.	Im	159	138
		Ix	805	946
CX	10 min.	Cl	210	197
		Cx	850	843
	90 min.	Cl	181	137
		Cx	896	562

Tabelle 28

Bei der Analyse wiedergefundene Mengen der N-Oxide und tertiären Amine in absoluten Werten (Nanogramm).

2000 ng N-Oxid	Inkuba- tions- zeit	Analyse	E D T A 500 µl Hämolysat	Heparin 500 µl Hämolysat
AX	10 min.	At	25	23
		Ax	75	77
	90 min.	At	24	23
		Ax	76	77
IX	10 min.	Im	12	12
		Ix	88	88
	90 min.	Im	16	13
		Ix	84	87
CX	10 min.	Cl	20	19
		Cx	80	81
	90 min.	Cl	17	20
		Cx	83	80

Tabelle 29

Prozentualer Anteil der tertiären Amine und N-Oxide.

	2000 ng N-Oxid	tertiäres Amin	E D T A 500 µl Hämolysat	Heparin 500 µl Hämolysat
Mittelwerte	AX	At	24	23
	IX	Im	14	12
	CX	Cl	18	19

Tabelle 30

Prozentualer Anteil der tertiären Amine nach Inkubation von N-Oxiden mit Hämolysat, bei Verwendung der beiden Antikoagulantien EDTA und Heparin.

Die Ergebnisse für die beiden Inkubationszeiten 10 Minuten und 90 Minuten wurden gemittelt, da sich kaum Unterschiede ergaben.

B.) Die Bedeutung der Alkalisierung des Inkubationsansatzes für die
Extraktionsausbeute.

Ax-Menge in ng		5.000	2.000	2.000	20.000	2.000	2.000	2.000	2.000
INKUBATION :		ohne Zusatz beim natürlichen pH des Hämolyzates pH 7,5		+ 100 µl 0,1 N HCl pH 7,4	+ 100 µl 0,1 N NaOH pH 7,7	+ 100 µl 0,1 N NaOH pH 7,7	+ 100 µl 0,1 N NaOH pH 7,7	+ 1 ml 0,1 N NaOH pH 10,3	2.000
EXTRAKTION :		---	+ 100µl 0,1 N NaOH pH 7,7	---	---	+ 1,1ml 0,1 N NaOH pH 10,3	---	+ 900µl 0,1 N NaOH pH 10,3	---
NANOGRAMM	At	1.690	779	330	6.640	340	847	238	208
	Ax	228	44	17	921	22	31	22	26
PROZENTE	At	88	95	95	88	94	96	92	89
	Ax	12	5	5	12	6	4	8	11

Tabelle 31

Bei der Analyse gemessene absolute Werte von At und Ax sowie deren prozentualer Anteil bei Inkubationen und Extraktionen bei verschiedenen pH-Werten.

Versuche zur relativen Extraktionsausbeute von N-Oxiden, tertiären Aminen und sekundären Aminen.

Bei der Analyse im Plasma wiedergefundene Substanzmengen:

- A) Tab. 32 . Bei Extraktion ohne Alkalisierung wurden von je 5.000 ng eingesetzter Substanz im Plasma wiedergefunden:

im Standard A :	im Standard I :	im Standard C :
Nt : 1.812 ng	DmI: 1.699 ng	DC : 1.441 ng
At : 2.540 ng	Im : 2.697 ng	Cl : 1.670 ng
Ax : 2.627 ng	Ix : 2.825 ng	Cx : 1.920 ng

- B) Tab. 33 . Bei Extraktion mit Alkalisierung (1 ml 0,1 N NaOH / ml Plasma) wurden von je 2.000 ng eingesetzter Substanz im Plasma wiedergefunden:

im Standard A :	im Standard I :	im Standard C :
Nt : 367 ng	DmI: 383 ng	DC : 537 ng
At : 419 ng	Im : 423 ng	Cl : 598 ng
Ax : 417 ng	Ix : 500 ng	Cx : 675 ng

Bei Division der gemessenen N-Oxid-Menge durch die Menge des jeweiligen Metaboliten (s. S. 37) ergeben sich die folgenden Extraktionsquotienten:

- A) Tab. 34 . Bei Extraktion ohne Alkalisierung:

Nt : 1.45	DmI: 1,66	DC : 1,33
<u>At : 1,03</u>	Im : 1,05	Cl : 1,15

- B) Tab. 35 . Bei Extraktion mit Alkalisierung:

Nt : 1,14	DmI: 1,31	DC : 1,26
<u>At : 1,00</u>	Im : 1,18	Cl : 1,15

Ergebnis-Tabellen zu :

2.) Die Reaktionsgeschwindigkeit

Inkubationszeit in Minuten	Analyse	50 µl Hämolytat A		250 µl Hämolytat B				1.000 µl Hämolytat C	
		+ 200 ng Ax	+ 2.000 ng Ax	+ 2.000 ng Ax	+ 20.000 ng Ax	+ 200 ng Ax	+ 2.000 ng Ax	+ 200 ng Ax	+ 2.000 ng Ax
2	At	28	220	234	246	4.450	4.095	46	408
	Ax	119	1.028	829	477	9.020	9.410	73	612
60	At	27	234	239	250	3.860	2.675	34	454
	Ax	96	1.238	656	634	8.530	7.155	47	729

Tabelle 36

Bei der Analyse gemessene Mengen von Amitriptylin und Amitriptylin-N-Oxid in Nanogramm nach der Inkubation von verschiedenen Mengen verschiedener Hämolytate mit verschiedenen Mengen Amitriptylin-N-Oxid für die beiden Inkubationszeiten : 2 Minuten und 60 Minuten.

Inkubationszeit	Analyse	50 µl Hämolysat A			250 µl Hämolysat B				1.000 µl Hämolysat C			Gesamt- Mittelwert
		+ ngAx	+ 2000 ngAx	Mittelwert	+ 2.000 ng Ax	+ 20.000 ng Ax	+ 2.000 ng Ax	Mittelwert	+ 200 ngAx	+ 2000 ngAx	Mittelwert	
2 min.	At	19	18	18	22	34	33	30	39	40	39	29
	Ax	81	82	82	78	66	67	70	61	60	61	71
60 min.	At	22	16	19	27	28	31	27	42	38	40	29
	Ax	78	84	81	73	72	69	73	58	62	60	71

Tabelle 37

Prozentualer Anteil von Amitriptylin und Amitriptylin-N-Oxid nach Inkubationen verschiedener Mengen verschiedener Hämolysate mit verschiedenen Ax-Mengen für die beiden Inkubationszeiten : 2 Minuten und 60 Minuten .

Ergebnis-Tabellen zu:

4.) Der Einfluß der Hämolysat-Menge

2.000 ng Ax inkubiert mit: Hämolysat-Menge in µl	Substanz	Nanogramm
10	At	29
	Ax	460
30	At	91
	Ax	819
90	At	161
	Ax	598
270	At	289
	Ax	230

Tabelle 38

Bei der Analyse gemessene absoluten Mengen an Amitriptylin und Amitriptylin-N-Oxid in Nanogramm nach der Inkubation von je 2.000 ng Ax mit verschiedenen Volumina plasmafreien Erythrocyten-Hämolysates.

Die hier angegebenen Werte sind Teil des in Versuch 10.) beschriebenen Experimentes. Sie erscheinen daher in Tab. 51 nochmals.

2.000 ng Ax inkubiert mit: Hämolysat-Menge in μ l	Substanz	Prozente
10	At	6
	Ax	94
30	At	10
	Ax	90
90	At	21
	Ax	79
270	At	56
	Ax	44

Tabelle 39

Prozentualer Anteil von Amitriptylin und Amitriptylin-N-Oxid nach Inkubationen von je 2.000 ng Ax mit verschiedenen Volumina plasmafreien Erythrocyten-Hämolysates.

Die hier angegebenen Werte sind Teils des in Versuch 10.) beschriebenen Experimentes, sie erscheinen daher in Tab. 52 nochmals.

Ergebnis-Tabellen zu :

5.) Der Einfluß der Amitriptylin-N-Oxid-Menge

eingesetzte Ax-Menge		Versuch 1 400 µl Hämolysat	Versuch 2 400 µl Hämolysat	Versuch 2 150 µl Hämolysat
200 ng	At	38	23	40
	Ax	34	24	60
2.000 ng	At	280		431
	Ax	340		670
20.000 ng	At		2.300	
	Ax		3.050	

Tabelle 40

Bei der Analyse gemessene absolute Mengen an Amitriptylin und Amitriptylin-N-Oxid in Nanogramm in drei unabhängigen Versuchen, bei denen - bei sonst identischen Versuchsbedingungen - verschiedene Mengen Ax verwendet wurden.

eingesetzte Ax-Menge		Versuch 1 400 µl Hämolysat	Versuch 2 400 µl Hämolysat	Versuch 3 150 µl Hämolysat
200 ng	At	53	49	40
	Ax	47	51	60
2.000 ng	At	45		39
	Ax	55		61
20.000 ng	At		43	
	Ax		57	

Tabelle 41

Prozentualer Anteil von Amitriptylin und Amitriptylin-N-Oxid in drei unabhängigen Versuchen, bei denen - bei sonst identischen Versuchsbedingungen - verschiedene Mengen Ax verwendet wurden.

Ergebnis-Tabellen zu :

6.) Der Einfluß der Temperatur

			0 ° C		37 ° C	
			5	60	5	60
2.000 ng	A X	At	234	239	246	250
		Ax	829	656	477	634
	I X	Im	151	160	116	124
		Ix	610	577	525	575
	C X	Cl	262	138	123	168
		Cx	498	662	650	742
20.000 ng	A X	At	4.450	3.860	4.095	2.675
		Ax	9.020	8.530	9.410	7.155
	I X	Im	2.755	1.925	2.325	2.165
		Ix	10.360	9.275	8.985	10.255
	C X	Cl	2.950	3.100	1.950	2.050
		Cx	10.070	11.775	9.150	9.645

Tabelle 42

Bei der Analyse gemessene absoluten Mengen der tertiären Amine (At, Im, Cl) und N-Oxide (Ax, Ix, Cx) in Nanogramm nach Inkubationen der verschiedenen N-Oxide mit Hämolystat bei 0°C und 37°C für 5 Minuten und 60 Minuten.

			0 ° C		3 7 ° C	
			5 min.	60 min.	5 min.	60 min.
2 . 0 0 0 n g	A X	At	22	27	34	28
		Ax	78	73	66	72
	I X	Im	20	22	18	18
		Ix	80	78	82	82
	C X	Cl	34	17	16	18
		Cx	66	83	84	77
2 0 . 0 0 0 n g	A X	At	33	31	30	27
		Ax	67	69	70	73
	I X	Im	21	17	21	17
		Ix	79	83	79	83
	C X	Cl	23	21	18	18
		Cx	77	79	82	82
Mittelwerte	A X	At	28	29	32	28
	I X	Im	20	19	19	18
	C X	Cl	29	19	17	18

Tabelle 43

Prozentualer Anteil der tertiären Amine (At, Im, Cl) und N-Oxide (Ax, Ix, Cx) nach Inkubationen der N-Oxide mit Hämolyat bei 0°C und 37°C für 5 Minuten und 60 Minuten.

Ergebnis-Tabellen zu :

8.) Der Einfluß verwandter Pharmaka

		zugegebene verwandte Pharmaka							
		ohne	D C		C l		DC+C1	Cx	C1 N
		Zusatz	2Tng	20Tng	2Tng	20Tng	20Tng	2Tng	20Tng
AX	At	488	614	698	801	562	719	1.193	633
	Ax	159	354	327	312	337	365	781	269

		zugegebene verwandte Pharmaka							
		ohne	D C		C l		DC+C1	Cx	C1 N
		Zusatz	2Tng	20Tng	2Tng	20Tng	20Tng	2Tng	20Tng
IX	Im	446	521	397	408	572	388	1.117	428
	Ix	304	475	417	428	439	399	1.125	511

		zugegebene verwandte Pharmaka							
		ohne	N t		A t		Nt+At	Ax	At N
		Zusatz	2Tng	20Tng	2Tng	20Tng	20Tng	2Tng	20Tng
CX	C1	553	448	504	439	435	304	1.157	326
	Cx	231	278	326	417	375	167	952	271

		zugegebene verwandte Pharmaka							
		ohne	D m I		I m		DmI+Im	Ix	Im N
		Zusatz	2Tng	20Tng	2Tng	20Tng	20Tng	2Tng	20Tng
CX	C1	553	560	819	699	632	596	1.181	361
	Cx	231	267	324	362	448	267	952	229

Tabelle 45

Bei der Analyse gemessene absoluten Mengen der tertiären Amine (At, Im, C1) und N-Oxide (Ax, Ix, Cx) in Nanogramm nach Zugabe verwandter Pharmaka zum Inkubationsansatz.

			zugegebene verwandte Pharmaka							
			ohne Zu- satz	D C		C l		DC+C1	C x	C1 N
				2Tng	20Tng	2Tng	20Tng	20Tng	2Tng	20Tng
AX	At	75	63	68	72	63	66	60	70	
	Ax	25	37	32	28	37	34	40	30	
IX	Im	60	52	49	49	57	49	50	46	
	Ix	40	48	51	51	43	51	50	54	

			zugegebene verwandte Pharmaka							
			ohne Zu- satz	N t		A t		Nt+At	A x	At N
				2Tng	20Tng	2Tng	20Tng	20Tng	2Tng	20Tng
CX	Cl	71	62	61	51	54	65	55	55	
	Cx	29	38	39	49	46	35	45	45	

			zugegebene verwandte Pharmaka							
			ohne Zu- satz	D m I		I m		DmI+Im	I x	Im N
				2Tng	20Tng	2Tng	20Tng	20Tng	2Tng	20Tng
CX	C1	71	68	72	66	59	69	55	61	
	Cx	29	32	28	34	41	31	45	39	

Tabelle 46

Prozentualer Anteil der tertiären Amine (At, Im, Cl) und N-Oxide (Ax, Ix, Cx) nach Zugabe verwandter Pharmaka zum Inkubationsansatz.

Ergebnis-Tabellen zu :

9.1.) Verdünnung von Hämolytat mit H₂O

Hämolytat- Verdünnung	Hämolytat- Menge (µl)	Volumen (µl)	Analyse	2 0 0 n g A x		2 . 0 0 0 n g A x	
				5 min.	60 min.	5 min.	60 min.
1/1	20	20	At	25	23	220	234
			Ax	121	72	1.028	1.238
	150	150	At	46	34	408	454
			Ax	73	46	612	729
1/10	2	20	At	8	10	92	25
			Ax	80	86	1.150	257
	15	150	At	14	16	419	152
			Ax	89	103	1.477	1.449
	150	1.500	At	18	26	234	255
			Ax	85	81	1.150	1.107

Tabelle 47

Bei der Analyse gemessene absolute Mengen von At und Ax in Nanogramm nach Inkubation unterschiedlicher Hämolytat-Volumina, die z. T. unverdünnt, z. T. mit H₂O im Verhältnis 1:10 verdünnt verwendet wurden mit Ax.

Hämolsat- Verdünnung	Hämolsat- Menge (µl)	Volumen (µl)	Analyse	2 0 0 n g		2 . 0 0 0 n g	
				A x		A x	
				5 min.	60 min.	5 min.	60 min.
1/1	20	20	At	17	24	18	16
			Ax	83	76	82	84
	150	150	At	39	42	40	39
			Ax	61	58	60	61
1/10	2	20	At	9	10	8	9
			Ax	91	90	92	91
	15	150	At	13	13	9	9
			Ax	87	87	91	91
	150	1.500	At	17	24	17	19
			Ax	83	76	83	81

Tabelle 48

Prozentualer Anteil von Amitriptylin und Amitriptylin-N-Oxid nach Inkubationen unterschiedlicher Hämolsat-Volumina, die z. T. unverdünnt, z.T. mit H₂O im Verhältnis 1 : 10 verdünnt verwendet wurden, mit Amitriptylin-N-oxid.

Ergebnis-Tabellen zu :

9.2.) Verdünnung von Hämolytat mit
HCl, NaOH und Blut-Plasma.

Versuch	Inkubations- zeit	Analyse	VERGLEICHS- Inkubation unverdünnt	V e r d ü n n u n g 1 : 1 l m i t					
				0,1 N HCl pH 1,5		0,1 N NaOH pH 12,7		Blut-Plasma	
				vorher	nachher	vorher	nachher	vorher	nachher
A	2 min.	Nt At Ax		8 33 290		5 92 337		4 145 11	
	60 min.	Nt At Ax		3 22 245		5 444 17		5 180 10	
B	60 min.	Nt At Ax		36 43 77		5 471 ---		8 113 ---	
C	60 min.	Nt At Ax		31 34 103		6 296 5		4 128 ---	

Tabelle 49

Bei der Analyse gemessene absolute Mengen an Nt, At und Ax

in Nanogramm bei Verdünnungen des Hämolytates im Verhältnis 1 : 11 mit 0,1 N HCl,

0,1 N NaOH und Blut-Plasma.

vorher: Verdünnung vor der Inkubation / nachher: Verdünnung nach der Inkubation
(vor der Extraktion)

Versuch	Inkubations- zeit	Analyse	VERGLEICHS- inkubation	VERDÜNNUNG 1 : 11 mit					
				0,1 N HCl		0,1 N NaOH		Blut-Plasma	
				vorher	nachh.	vorher	nachh.	vorher	nachh.
A	2 min	Nt	unverdünnt	2	/	1	/	2	/
		At		10		21		94	
		Ax		88		78		4	
	60 min	Nt	2	1	2	1	2	3	2
		At		8	15	95	37	92	95
		Ax		91	83	4	61	5	3
B	60 min	Nt	2	23	16	1	2	7	4
		At		28	47	99	55	93	96
		Ax		49	37	--	43	--	--
C	60 min	Nt	2	18	23	2	2	3	3
		At		20	35	96	56	97	94
		Ax		62	42	2	42	--	3

Tabelle 50

Prozentualer Anteil von Nt, At und Ax bei Verdünnungen des Hämolysates im Verhältnis 1:11 mit 0,1 N HCl, 0,1 N NaOH und Blut-Plasma.

vorher: Verdünnung vor der Inkubation / nachh.: Verdünnung nach der Inkubation (vor der Extraktion)

Ergebnis-Tabellen zu :

10.) Der Einfluß zugegebenen Plasmas.

		zugegebene P L A S M A - M E N G E :						
		----	10 µl	30 µl	90 µl	270 µl	810 µl	2430 µl
H Ä M O L Y S A T I M E N G E	10 µl	At	29					
		Ax	460	74	90	137	167	84
	30 µl	At	91	96	101	134	218	518
		Ax	819	773	627	344	160	51
	90 µl	At	161		120	141	249	357
		Ax	598		284	351	90	---
	270 µl	At	289			356	239	99
		Ax	230			103	56	---

Tabelle 51

Bei der Analyse gemessene absolute Mengen an Amitriptylin und Amitriptylin-N-Oxid in Nanogramm nach Inkubationen, in denen unterschiedlichen Hämolyse-Volumina verschiedene Plasmaprodukte beigemischt wurden.

		zugegebene P L A S M A - M I N G E						
		10 µl	30 µl	90 µl	270 µl	810 µl	2430 µl	
H Ä M O L Y S A T M E N G E	10 µl	6 At Ax	5 8 94 Ax	11 89	22 78	28 72	12 88	
	30 µl	10 At Ax	11 89	14 86	28 72	58 42	91 9	
	90 µl	21 At Ax	79	30 70	29 71	73 27	100 --	
	270 µl	56 At Ax	44					100 --

Tabelle 52
Prozentualer Anteil von Amitriptylin und Amitriptylin-N-oxid nach Inkubationen, in denen unterschiedlichen Hämolyse-Volumina verschiedene Plasma-Volumina beigemischt wurden.

Ergebnis-Tabelle zu :

11.) Schrittweiser Ersatz von Hämolytat
durch Blut-Plasma.

Verdünnungsgrad Hämolytat / Plasma		Ergebnisse in absoluten Werten (Nanogramm)	Ergebnisse in Prozent
1 : 1	At	298	49
	Ax	306	51
1 : 10	At	122	17
	Ax	581	83
1 : 100	At	64	8
	Ax	724	92
1 : 1.000	At	7	1
	Ax	810	99
1 : 10.000	At	9	1
	Ax	926	99
1 : 100.000	At	---	0
	Ax	979	100
1 : 1.000.000	At	4	0
	Ax	985	100

Tabelle 53

Bei der Analyse gemessene absolute Mengen an Amitriptylin und Amitriptylin-N-Oxid in Nanogramm, sowie deren prozentuale Anteile nach schrittweisem Ersatz von 200 µl Hämolytat durch Blut-Plasma bis zu einer Verdünnung von 1 : 1 Million.

Ergebnis-Tabellen zu :

12.) Interindividuelle Variabilität und Unterschiede
zwischen verschiedenen N-Oxiden innerhalb eines
Experimentes.

		B l u t <u>1</u>		B l u t <u>2</u>		B l u t <u>3</u>	
		Erys	Plasma	Erys	Plasma	Erys	Plasma
AX	At	62	78	59	39	72	33
	Ax	99	2.008	153	1.758	132	1.183
IX	Im	30	80	98	21	93	59
	Ix	153	1.594	125	1.019	156	919
Cx	C1	16	23	51	23	63	16
	Cx	87	1.635	64	1.388	52	894

Tabelle 54

Bei der Analyse gemessene absolute Mengen an Amitriptylin und Amitriptylin-N-oxid in Nanogramm in Erythrocyten und Plasma nach Inkubationen von Blut dreier verschiedener Versuchspersonen mit drei verschiedenen N-Oxiden.

		B l u t <u>1</u>		B l u t <u>2</u>		B l u t <u>3</u>		Mittel- werte
		Erys	Plasma	Erys	Plasma	Erys	Plasma	
AX	At	39	4	28	2	35	3	34
	Ax	61	96	72	98	65	97	
IX	Im	16	5	44	2	37	6	32
	Ix	84	95	56	98	63	94	
CX	Cl	16	1	44	2	55	2	38
	Cx	84	99	56	98	45	98	
Mittel tertiäre Amine		24		39		42		

Tabelle 55

Prozentualer Anteil von Amitriptylin und Amitriptylin-N-Oxid einzeln für jedes Kompartiment (Erythrocyten und Plasma) nach Inkubationen von Blut dreier verschiedener Versuchspersonen mit drei verschiedenen N-Oxiden (Amitriptylin-N-Oxid, Imipramin-N-Oxid und Chlorimipramin-N-Oxid).

Einsatz	Analyse	Blut <u>1</u>		Blut <u>2</u>		Blut <u>3</u>		Mittel E
		E	P	E	P	E	P	
AX	At	3	4	3	2	5	2	4
	Ax	4	89	8	87	9	84	
IX	Im	2	4	8	2	7	5	6
	Ix	8	86	10	80	13	75	
CX	Cl	1	1	3	2	6	2	3
	Cx	5	93	4	91	5	87	
Mittelwert der tertiären Amine:		2		5		6		

Tabelle 56

Prozentualer Anteil von Amitriptylin und Amitriptylin-N-Oxid gemeinsam für Erythrocyten und Plasma

(Ax + At in Erythrocyten + Plasma = 100 %)
 nach Inkubationen von Blut dreier verschiedener Versuchspersonen mit drei verschiedenen N-Oxiden (Ax, Ix, Cx).

Einsatz	Blut <u>1</u>		Blut <u>2</u>		Blut <u>3</u>		Mittel E
	E	P	E	P	E	P	
AX	7	93	11	89	14	86	11
IX	10	90	18	82	20	80	16
CX	6	94	7	93	11	89	8
Mittel:	8		12		15		

Tabelle 57

Substanzverteilung zwischen Erythrocyten und Blut-Plasma nach Inkubationen von Blut dreier verschiedener Versuchspersonen mit drei verschiedenen N-Oxiden.

Die Werte dieser Tabelle errechnen sich aus Tab. 56 durch Addition der Prozentsätze für das tertiäre Amin und das N-Oxid in jedem Kompartiment.

Einsatz	Analyse	Blut <u>1</u> Erys + Plasma	Blut <u>2</u> Erys + Plasma	Blut <u>3</u> Erys + Plasma	Mittel
AX	At	7	5	7	6
IX	Im	6	10	12	9
CX	Cl	2	5	8	5
Mittelwerte :		5	7	9	

Tabelle 58

Gesamtumsatz (= Anteil des tertiären Amins in Erythrocyten + Plasma) nach Inkubationen von Blut dreier Verschiedener Versuchspersonen mit drei verschiedenen N-Oxiden. Die Werte dieser Tabelle errechnen sich aus Tab. 56 durch Addition der beiden Prozentsätze für das tertiäre Amin (in Erythrocyten und in Plasma) und der beiden Prozentsätze für das N-Oxid.

Ergebnis-Tabellen zu :

13.) VERGLEICH :

Erythrocyten in Blut-Plasma - Erythrocyten in Puffer

Suspension	Komparti- ment	Substanz	200 ng Ax		2.000 ng Ax	
			5 min	60 min	5 min	60 min
Erys in plasma	Erys	At	20	13	250	220
		Ax	2	1	10	10
	Plasma	At	14	17	140	120
		Ax	75	77	650	770
Erys in Puffer	Erys	At	33	55	450	450
		Ax	3	5	45	50
	Puffer	At	4	0	17	24
		Ax	46	50	475	490

Tabelle 59

Bei der Analyse gemessene absolute Mengen an Amitriptylin und Amitriptylin-N-Oxid in Nanogramm in Erythrocyten und Plasma/Puffer bei Vollblut-Inkubationen und Inkubationen von Erythrocyten-in-Puffer-Suspensionen.

Suspension	Kompartiment	Analyse	200 ng Ax		2.000 ng Ax		Mittelwert
			5 min	60 min	5 min	60 min	
Erys in Plasma	Erys	At	91	93	96	96	94
		Ax	9	7	4	4	6
	Plasma	At	24	18	18	13	18
		Ax	76	82	82	87	82
Erys in Puffer	Erys	At	92	92	91	90	91
		Ax	8	8	9	10	9
	Puffer	At	8	0	3	5	4
		Ax	82	100	97	95	96

Tabelle 60

Prozentualer Anteil von Amitriptylin und Amitriptylin-N-Oxid einzeln für jedes Kompartiment (Erythrocyten / Plasma) bei Vollblut-Inkubationen und Inkubationen von Erythrocyten in PBS-Puffer.

Suspension	Kompartiment	Substanz	200 ng Ax		2.000 ng Ax		Mittelwert
			5 min	60 min	5 min	60 min	
Erys in Plasma	Erys	At	18	12	24	19	18
		Ax	2	1	1	1	1
	Plasma	At	12	16	13	11	13
		Ax	68	71	62	69	68
Erys in Puffer	Erys	At	38	50	45	45	45
		Ax	4	4	5	5	4
	Puffer	At	5	0	2	2	2
		Ax	53	46	48	48	49

Tabelle 61

Prozentualer Anteil von Amitriptylin und Amitriptylin-N-Oxid gemeinsam für Erythrocyten und Plasma/Puffer

(At + Ax in Erythrocyten + Plasma/Puffer = 100 %)
bei Vollblut-Inkubationen und Inkubationen von Erythrocyten in PBS-Puffer.

Suspension	Kompartment	200 ng Ax		2.000 ng Ax		Mittelwert
		5 min	60 min	5 min	60 min	
Erys in Plasma	Erys	20	13	25	21	19
	Plasma	80	87	75	79	81
Erys in Puffer	Erys	42	54	50	50	49
	Puffer	58	46	50	50	51

Tabelle 62

Substanzverteilung zwischen Erythrocyten und Blut-Plasma/Puffer bei Inkubationen von Vollblut und von Erythrocyten-in-Puffer-Suspensionen.

Die Werte dieser Tabelle errechnen sich aus Tab. 61 durch Addition der Prozentsätze für das tertiäre Amin plus der für das N-Oxid in jedem Kompartiment.

Suspension	Analyse	200 ng Ax		2.000 ng Ax		Mittelwert
		5 min	60 min	5 min	60 min	
Erys in Plasma	At	30	28	37	30	31
	Ax	70	72	63	70	69
Erys in Puffer	At	43	50	47	47	47
	Ax	57	50	53	53	53

Tabelle 63

Gesamtumsatz (= Anteil des Amitriptylins in Erythrocyten + Plasma/Puffer) bei Vollblut-Inkubationen und Inkubationen von in Puffer suspendierten Erythrocyten. Die Werte dieser Tabelle errechnen sich aus Tab. 61 durch Addition der beiden Prozentsätze für das Amitriptylin bzw. derjenigen für das Amitriptylin-N-Oxid.

Ergebnis-Tabellen zu :

14.) Stufenweise Verdünnung des Plasmas mit PBS-Puffer
und H₂O und Verdünnung von PBS-Puffer mit H₂O.

VERSUCH 1		Frys	Plasma (%):			Puffer (%):			Wasser (%):			0			20			40			60			80			100		
			At	Ax	At	Ax	At	Ax	At	Ax	At	Ax	At	Ax	At	Ax	At	Ax	At	Ax	At	Ax	At	Ax	At	Ax	At	Ax	
VERSUCH 1	Frys	At	93	98	173	165	259	209	80	144	80	144	80	144	80	144	80	144	80	144	80	144	80	144	80	144	80	144	
		Ax	37	35	71	153	148	157	31	46	31	46	31	46	31	46	31	46	31	46	31	46	31	46	31	46	31	46	
	Medium	At	13	9	12	56	78	72	15	31	15	31	15	31	15	31	15	31	15	31	15	31	15	31	15	31	15	31	
		Ax	1.066	1.023	991	688	514	457	675	907	675	907	675	907	675	907	675	907	675	907	675	907	675	907	675	907	675	907	
VERSUCH 2	Frys	At	105	196	130	182	228	228	52	46	52	46	52	46	52	46	52	46	52	46	52	46	52	46	52	46	52	46	
		Ax	24	84	52	184	177	114	35	20	35	20	35	20	35	20	35	20	35	20	35	20	35	20	35	20	35		
	Medium	At	11	15	12	97	55	55	12	19	12	19	12	19	12	19	12	19	12	19	12	19	12	19	12	19	12	19	
		Ax	973	1.191	794	465	347	345	862	695	862	695	862	695	862	695	862	695	862	695	862	695	862	695	862	695	862	695	

Tabelle 64

Bei der Analyse gemessene absolute Mengen an Amitriptylin und Amitriptylin-N-Oxid in Nanogramm in Erythrocyten und Medium bei stufenweiser Verdünnung von dem die Erythrocyten umgebenden Plasma durch PBS-Puffer und Wasser, bzw. von PBS-Puffer durch Wasser.

Plasma (%):		100	80	60	0	0	0	80	60
Puffer (%):		0	20	40	100	80	60	0	0
Wasser (%):		0	0	0	0	20	40	20	40
Erys	At	76	72	71	51	60	62	65	73
	Ax	24	28	29	49	40	38	35	27
Medium	At	1	1	1	12	14	14	2	2
	Ax	99	99	99	88	86	86	98	98

Tabelle 65

Prozentualer Anteil von Amitriptylin und Amitriptylin-N-Oxid einzeln für jedes Kompartiment (Erythrocyten / Medium) bei stufenweiser Verdünnung des die Erythrocyten umgebenden Plasmas mit PBS-Puffer und Wasser , bzw. von PBS-Puffer mit Wasser.

Plasma (%):		100	80	60	0	0	0	80	60
Puffer (%):		0	20	40	100	80	60	0	0
Wasser (%):		0	0	0	0	20	40	20	40
Erys	At	8	11	14	17	27	27	8	9
	Ax	3	4	5	17	18	16	4	3
Medium	At	1	1	1	8	8	8	2	2
	Ax	88	84	80	58	47	49	86	86

Tabelle 66

Prozentualer Anteil von Amitriptylin und Amitriptylin-N-Oxid gemeinsam für Erythrocyten und Medium

(At + Ax in Erythrocyten + Medium = 100 %)

bei stufenweiser Verdünnung des die Erythrocyten umgebenden Plasmas mit PBS-Puffer und Wasser bzw. des PBS-Puffers mit Wasser.

Plasma (%):	100	80	60	0	0	0	80	60
Puffer (%):	0	20	40	100	80	60	0	0
Wasser (%):	0	0	0	0	20	40	20	40
Erys	12	15	19	34	45	43	12	12
Medium	88	85	81	66	55	57	88	88

Tabelle 67

Substanzverteilung zwischen Erythrocyten und Medium bei stufenweiser Verdünnung des die Erythrocyten umgebenden Plasmas mit PBS-Puffer und Wasser, bzw. des PBS-Puffers mit Wasser.

Die Werte dieser Tabelle errechnen sich aus Tab. 66 durch Addition der Prozentsätze für das teriäre Amin plus derjenigen für das N-Oxid in jedem Kompartiment.

Plasma (%):	100	80	60	0	0	0	80	60
Puffer (%):	0	20	40	100	80	60	0	0
Wasser (%):	0	0	0	0	20	40	20	40
At	9	12	15	25	35	35	10	11
Ax	91	88	85	75	65	65	90	89

Tabelle 68

Gesamtumsatz (= Anteil des Amitriptylins in Erythrocyten + Medium) bei stufenweiser Verdünnung des die Erythrocyten umgebenden Plasmas mit PBS-Puffer und Wasser , bzw. des PBS-Puffers mit Wasser.

Die Werte dieser Tabelle errechnen sich aus Tab. 66 durch Addition der beiden Prozentsätze für das Amitriptylin bzw. derjenigen für das Amitriptylin-N-Oxid.

Ergebnis-Tabellen zu :

15.) Verteilungen der Gesamtsubstanz, endogenen und exogenen Amitriptylins in Vollblut und in Suspensionen von Erythrocyten in PBS-Puffer.

Einsatz	Kompartiment	Analyse	V O L L B L U T			Erys in Puffer		
			2 min	60 min	22 Std	2 min	60 min	22 Std
AX	Erys	At	283	432	116	335	450	257
		Ax	207	415	124	195	314	202
	Med.	At	20	30	22	12	35	49
		Ax	3339	3252	2633	415	418	462
AT	Erys	At	56	182	94	168	170	147
	Med.	At	382	333	226	63	30	67

Tabelle 69

Bei der Analyse gemessene absolute Mengen an Amitriptylin und Amitriptylin-N-oxid in Nanogramm in Erythrocyten und dem sie umgebenden Medium (Plasma / Puffer) nach Inkubationen von Ax bzw. At mit Vollblut und mit Suspensionen von Erythrocyten in PBS-Puffer.

Zusatz	Kompartiment	Analyse	V O L L B L U T			Erys in Puffer		
			2 min	60 min	22 Std	2 min	60 min	22 Std
AX	Erys	At	58	51	48	63	59	56
		Ax	42	49	52	37	41	44
	Med.	At	1	1	1	3	8	10
		Ax	99	99	99	97	92	90

Tabelle 70

Prozentualer Anteil von Amitritriptylin und Amitriptylin-N-Oxid einzeln für jedes Kompartiment (Erythrocyten / Medium) nach Inkubationen von Ax bzw. At mit Vollblut und mit Suspensionen von Erythrocyten in PBS-Puffer für verschiedene Inkubationszeiten.

Einsatz	Kompar- timent	Analyse	V O L L B L U T			Erys in Puffer		
			2 min	60 min	22 Std	2 min	60 min	22 Std
Ax	Erys	At	7	10	4	35	37	26
		Ax	5	10	4	21	26	21
	Med.	At	1	1	1	1	3	5
		Ax	87	79	91	43	34	47

Tabelle 71

Prozentualer Anteil von Amitriptylin und Amitriptylin-N-Oxid gemeinsam für Erythrocyten und Plasma bzw. Puffer nach Inkubationen von Ax bzw. At mit Vollblut und mit Suspensionen von Erythrocyten un PBS-Puffer für verschiedene Inkubationszeiten.

Einsatz	Analyse	V O L L B L U T			Erys in Puffer		
		2 min	60 min	22 Std	2 min	60 min	22 Std
AX	At	8	11	5	36	40	31
	Ax	92	89	95	64	60	67

Tabelle 72

Gesamtumsatz (= Anteil des Amitriptylins in Erythrocyten + Medium) nach den Inkubationen von Ax mit Vollblut und mit Suspensionen von Erythrocyten in PBS-Puffer für verschiedene Inkubationszeiten.

Die Werte dieser Tabelle errechnen sich aus Tab. 71 durch Addition der beiden Prozentsätze für das tertiäre Amin bzw. derjenigen für das N-Oxid.

Einsatz	Kompartiment	V O L L B L U T			Erys in Puffer		
		2 min	60 min	22 Std	2 min	60 min	22 Std
AX	Erys	12	20	8	56	63	47
	Medium	83	80	92	44	37	53
AT	Erys	13	35	29	73	85	69
	Medium	87	65	71	27	15	31

Tabelle 73

Substanzverteilung zwischen Erythrocyten und Medium nach Inkubationen von Ax bzw. At mit Vollblut und mit Suspensionen von Erythrocyten in PBS-Puffer für verschiedene Inkubationszeiten.

Die Werte dieser Tabelle errechnen sich aus Tab. 71 durch Addition der Prozentsätze für das tertiäre Amin plus derjenigen für das N-Oxid in jedem Kompartiment.

Einatz	Kompartiment	V O L L B L U T			Erys in Puffer		
		2 min	60 min	22 Std	2 min	60 min	22 Std
AX	Erys	93	93	84	97	93	84
	Medium	7	7	16	3	7	16
AT	Erys	13	35	29	73	85	69
	Medium	87	65	71	27	15	31

Tabelle 74

Verteilung des endogenen bzw. des exogenen Amitriptylins
nach Inkubationen von Ax bzw. At mit Vollblut und mit Suspensionen von Erythrocyten in PBS-Puffer für verschiedene Inkubationszeiten.

Ergebnis-Tabellen zu :

16.) Temperatur- und Zeitabhängigkeit des Pharmakoneinstroms
in die Erythrocyten bei zwei verschiedenen N-Oxiden.

Einsatz	Kompartiment	Analyse	0 ° C			37 ° C		
			3 min		90 min	3 min		90 min
AX	Erys	At	37	34	49	51	107	129
		Ax	10	9	49	83	45	48
	Plasma	At	14	13	9	15	15	18
		Ax	773	796	576	889	1.006	949
IX	Erys	Im	42	46	56	172	192	113
		Ix	13	16	44	125	121	104
	Plasma	Im	40	15	13	14	15	14
		Ix	1.104	1.024	683	806	1.105	855

Tabelle 75

Bei der Analyse gemessene absolute Menge der tertiären Amine (At, Im) und N-Oxide (Ax, Ix) in Nanogramm in Erythrocyten und Plasma nach Inkubationen von Ax und Ix mit Vollblut bei 0°C und bei 37°C für 3 Minuten und für 90 Minuten.

Einsatz	Kompartiment	Analyse	0 ° C		37 ° C	
			3 min.	90 min.	3 min.	90 min.
A x	Erys	At	78	50	54	73
		Ax	22	50	46	27
	Plasma	At	2	2	2	2
		Ax	98	98	98	98
I x	Erys	Im	75	56	60	52
		Ix	25	44	40	48
	Plasma	Im	2	2	2	2
		Ix	98	98	98	98

Tabelle 76

Prozentualer Anteil der tertiären Amine (At, Im) und der N-Oxide (Ax, Ix) einzeln für Erythrocyten und Plasma nach Inkubationen von Ax und Ix mit Vollblut bei 0°C und bei 37°C für 3 Minuten und für 90 Minuten.

Die Doppelbestimmungen (3-Minuten-Werte) sind gemittelt.

Einsatz	Kompartiment	Analyse	0 ° C		37 ° C	
			3 min.	90 min.	3 min.	90 min.
A X	Erys	At	4	7	7	11
		Ax	1	7	6	4
	Plasma	At	2	1	1	2
		Ax	93	85	86	83
I X	Erys	Im	4	7	14	10
		Ix	1	5	10	10
	Plasma	Im	2	2	1	1
		Im	93	86	75	79

Tabelle 77

Prozentualer Anteil der tertiären Amine (At, Im) und der N-Oxide (Ax, Ix) gemeinsam für Erythrocyten und Plasma (At + Ax in Erythrocyten + Plasma = 100 %) nach Inkubationen von Ax und Ix mit Vollblut bei 0°C und bei 37°C .

Die Doppelbestimmungen (3-Minuten-Werte) sind gemittelt.

Einsatz	Analyse	0 ° C		37 ° C	
		3 min.	90 min.	3 min.	90 min.
A X	Erys	5	14	13	15
	Plasma	95	86	87	85
I X	Erys	5	12	24	20
	Plasma	95	88	76	80

Tabelle 78

Substanzverteilung zwischen Erythrocyten und Plasma nach Inkubationen von Ax und Ix mit Vollblut bei 0°C und bei 37°C für 3 Minuten und für 90 Minuten.

Die Doppelbestimmungen (3-Minuten-Werte) sind gemittelt.

Die Werte dieser Tabelle errechnen sich aus Tab. 77

durch Addition der Prozentsätze für das tertiäre Amin plus derjenigen für das N-Oxid in jedem Kompartiment.

Einsatz	Analyse	0 ° C		37 ° C	
		3 min.	90 min.	3 min.	90 min.
A X	At	6	8	8	13
	Ax	96	92	92	87
I M	Im	6	9	15	11
	Ix	94	91	85	89

Tabelle 79

Gesamtumsatz (= Anteil des tertiären Amins in Erythrocyten + Plasma) nach Inkubationen von Ax und Ix mit Vollblut bei 0°C und bei 37°C für 3 Minuten und für 90 Minuten.

Die Doppelbestimmungen (3-Minuten-Werte) sind gemittelt.

Die Werte dieser Tabelle errechnen sich aus Tab. 77 durch Addition der beiden Prozentsätze für das tertiäre Amin bzw. derjenigen für das N-Oxid.

Ergebnis-Tabellen zu :

17.1 VERGLEICH: Pharmakontransport aus dem Plasma in die Erythrocyten -
Pharmakontransport aus den Erythrocyten ins Plasma .

Bei diesem Experiment erscheint es ausnahmsweise angebracht, in der Tabelle mit den absoluten Werten die Ergebnisse für Nortriptylin mit anzugeben.

Vorinkubation, Erythrocyten

Nt	76	88
At	1.624	1.565
Ax	848	963

Diese Erythrocyten wurden in der Hauptinkubation weiterverwendet. ("Beladene Erythrocyten")

Hauptinkubation

Zusatz	Kompartiment	Analyse	Transport-Richtung			
			Plasma → Erys		Erys → Plasma	
AX	Erys	Nt:	0	0	8	10
		At:	119	152	235	259
		Ax:	55	76	150	147
	Plasma	Nt:	5	2	13	11
		At:	5	11	21	30
		Ax:	963	1.031	1.633	1.909
AT	Erys	At:	469	505	783	903
	Plasma	At:	694	1.019	1.893	1.407

Tabelle 80

Bei der Analyse gemessene absoluten Mengen an Nortriptylin, Amitriptylin und Amitriptylin-N-Oxid in Nanogramm in Plasma und Erythrocyten nach Inkubationen pharmakonfreier Erythrocyten in pharmakonhaltigem Plasma und Inkubationen pharmakonhaltiger Erythrocyten in pharmakonfreiem Plasma.

Vorinkubation, Erythrocyten

At	64 %
Ax	36 %

Diese Erythrocyten wurden in der Hauptinkubation weiterverwendet ("beladene erythrocyten").

Hauptinkubation

Zusatz	Kompartiment	Analyse	A		B	
			Transport-Richtung		Transport-Richtung	
			Plasma ↓ Erys	Erys ↓ Plasma	Plasma ↓ Erys	Erys ↓ Plasma
A X	Erys	At	67	62	11	11
		Ax	33	38	5	7
	Plasma	At	1	2	1	1
		Ax	99	98	83	81
A T	Erys	At	X		36	34
	Plasma	At			64	66

Tabelle 81

Prozentualer Anteil von Amitriptylin und Amitriptylin-N-Oxid einzeln für jedes Kompartiment (Erythrocyten / Plasma) (Spalte "A"), sowie gemeinsam für Erythrocyten und Plasma (Spalte "B") nach Inkubationen pharmakonfreier Erythrocyten in pharmakonhaltigem Plasma und Inkubationen pharmakonhaltiger Erythrocyten (aus der Vorinkubation) in pharmakonfreiem Plasma.

Die Doppelbestimmungen wurden gemittelt.

Die Werte des Nortriptylins blieben für die Prozentberechnung unberücksichtigt.

Zusatz	Kompartiment	Transport-Richtung	
		Plasma ↓ Erys	Erys ↓ Plasma
A X	Erys	16	18
	Plasma	84	82
A T	Erys	36	34
	Plasma	64	66

Tabelle 82

Substanzverteilung zwischen Erythrocyten und Plasma nach Inkubationen pharmakonfreier Erythrocyten in pharmakonhaltigem Plasma und Inkubationen pharmakonhaltiger Erythrocyten (aus der Vorinkubation) in pharmakonfreiem Plasma.

Die Werte dieser Tabelle errechnen sich aus Tab. 81 Spalte "B" durch Addition der Prozentsätze für Amitriptylin plus derjenigen für Amitriptylin-N-oxid in jedem Kompartiment.

Zusatz	Analyse	Transport- Richtung	
		Plasma ↓ Erys	Erys ↓ Plasma
A X	At	12	12
	Ax	88	88

Tabelle 83

Gesamtumsatz (= Amitriptylin-Anteil in Erythrocyten + Plasma) nach Inkubationen von pharmakonfreien Erythrocyten in pharmakonhaltigem Plasma und Inkubationen von pharmakonhaltigen Erythrocyten (aus der Vorinkubation) in pharmakonfreiem Plasma.

Die Werte dieser Tabelle errechnen sich aus Tabelle 81 Spalte "B", durch Addition der beiden Prozentsätze für das Amitriptylin, bzw. derjenigen für das Amitriptylin-N-Oxid.

Ergebnis-Tabellen zu :

18.) Die Bedeutung des Mediums für den Pharmakontransport
in die Erythrocyten hinein, bzw. aus ihnen heraus.

VORINKUBATION		Transport- Richtung: PLASMA → ERYs		250 µl Plasma		500 µl Plasma		1 ml Plasma		500 µl Puffer		
				At		632	627					Ax
		Plasma					5.276					
H A U P T I N K U B A T I O N		Transport- Richtung: MEDIUM → ERYs		At	120	92	105	108	31	34	147	185
				Ax	135	128	99	93	39	26	216	271
		Medium		At	18	38	18	20	7	18	40	70
				Ax	574	616	622	707	1.090	974	383	456
H A U P T I N K U B A T I O N		Transport- Richtung: ERYs → MEDIUM		At	493	698	376	311	208	294	490	476
				Ax	338	386	269	230	159	226	639	586
		Medium		At	133	127	36	8	17	24	177	138
				Ax	853	1.600	1.885	1.961	2.282	3.320	1.011	723

Tabelle 84

Bei der Analyse gemessene absolute Mengen an Amitriptylin und Amitriptylin-N-Oxid in Nanogramm bei der Vorinkubation (Beladen der Erythrocyten mit Amitriptylin) und nach Inkubationen von pharmakonfreien Erythrocyten mit pharmakonhaltigem Plasma / Puffer und nach Inkubationen von pharmakonhaltigen Erythrocyten mit pharmakonfreiem Plasma / Puffer.

				250 µl Plasma	500 µl Plasma	1 ml Plasma	500 µl Puffer	
VORINKUBATION	Transport- Richtung: PLASMA → ERYs	Erys	At		51			
			Ax		49			
		Plasma	At		1			
			Ax		99			
H A U P T I N K U B A T I O N	Transport- Richtung: MEDIUM → ERYs	Erys	At	45	53	50	39	
			Ax	55	47	50	61	
		Medium	At	5	3	1	12	
			Ax	95	97	99	88	
	H A U P T I N K U B A T I O N	Transport- Richtung: ERYs → MEDIUM	Erys	At	62	58	57	44
Ax				38	42	43	56	
Medium			At	10	1	1	15	
			Ax	90	99	99	85	

Tabelle 85

Prozentuale Anteile von Amitriptylin und Amitriptylin-N - Oxid einzeln für jedes Kompartiment (Erythrocyten / Medium) nach der Vorinkubation (Beladen der Erythrocyten mit Ax/At) und nach Inkubationen von pharmakonfreien Erythrocyten mit pharmakonhaltigem Plasma / Puffer bzw. nach Inkubationen von pharmakonhaltigen Erythrocyten (aus der Vorinkubation) mit pharmakonfreiem Plasma / Puffer .

Die Doppelbestimmungen sind gemittelt.

				250 µl Plasma	500 µl Plasma	1 ml Plasma	500 µl Puffer	
VORINKUBATION	Transport- Richtung: PLASMA → ERYs	Erys	At		10			
			Ax		10			
		Plasma	At		1			
			Ax		79			
H A U P T I N K U B A T I O N	Transport- Richtung: MEDIUM → ERYs	Erys	At	13	12	3	18	
			Ax	15	11	3	28	
		Medium	At	3	2	1	6	
			Ax	69	75	93	48	
		Transport- Richtung: ERYs → MEDIUM	Erys	At	26	13	8	23
				Ax	16	10	6	29
			Medium	At	5	1	1	7
Ax	53			76	85	41		

Tabelle 86

Prozentuale Anteile von Amitriptylin und Amitriptylin-N-Oxid gemeinsam für Erythrocyten und Plasma / Puffer nach der Vorinkubation (Beladen der Erythrocyten mit Ax/At) und nach Inkubationen von pharmakonfreien Erythrocyten mit pharmakonhaltigem Plasma / Puffer bzw. nach Inkubationen von pharmakonhaltigen Erythrocyten (aus der Vorinkubation) mit pharmakonfreiem Plasma / Puffer.
Die Doppelbestimmungen sind gemittelt.

			250 µl Plasma	500 µl Plasma	1 ml Plasma	500 µl Puffer
VOR- INKU- BATION	PLASMA ↓ ERYS	Erys		20		
		Plasma		80		
HAUPTINKUBATION	MEDIUM ↓ ERYS	Erys	28	23	6	46
		Medium	72	77	94	54
	ERYS ↓ MEDIUM	Erys	42	23	14	52
Medium		58	77	86	48	

Tabelle 87

Substanzverteilung zwischen Erythrocyten und Medium (Plasma / PBS-Puffer) nach der Vorinkubation und nach Inkubationen von pharmakonfreien Erythrocyten mit pharmakonhaltigem Medium bzw. nach Inkubationen von pharmakonhaltigen Erythrocyten mit pharmakonfreiem Medium.

Die Werte dieser Tabelle errechnen sich aus Tab. 86 durch Addition der Prozentsätze für Amitriptylin plus derjenigen für Amitriptylin-N-Oxid in jedem Kompartiment.

			250 µl Plasma	500 µl Plasma	1 ml Plasma	500 µl Puffer
VOR- INKU- BATION	PLASMA ↓ ERYS	At		11		
		Ax		89		
HAUPTINKUBATION	MEDIUM ↓ ERYS	At	16	14	4	24
		Ax	84	86	96	76
	ERYS ↓ MEDIUM	At	31	14	9	30
		Ax	69	86	91	70

Tabelle 88

Gesamtumsatz (Amitriptylin in Erythrocyten + Medium) in der Vorinkubation und nach Inkubationen von pharmakonfreien Erythrocyten in pharmakonhaltigem Medium bzw. Inkubationen von pharmakonhaltigen Erythrocyten in pharmakonfreiem Medium.

Die Werte dieser Tabelle errechnen sich aus Tab. 86 durch Addition der beiden Prozentsätze für das At bzw. der beiden Prozentsätze für das Ax in den beiden Kompartimenten.

			Erys/ Plasma= 2 : 1	Erys/ Plasma= 1 : 1	Erys/ Plasma= 1 : 2	Erys/ Puffer= 1 : 1
Vor- inkubation	Erys	At		25		
		Ax		75		
	Plasma	At		0		
		Ax		100		
1. Haupt- inkubation	Erys	At	28	28	44	33
		Ax	72	72	56	67
	Medium	At	4	6	2	12
		Ax	96	94	98	88
2. Haupt- inkubation	Erys	At	44	56	47	56
		Ax	56	44	53	44
	Medium	At	3	0	0	7
		Ax	97	100	100	93

Tabelle 90

Prozentualer Anteil von Amitriptylin und Amitroptylin-N-Oxid einzeln für jedes Kompartiment (Erythrocyten / Medium) nach der Vorinkubation (Beladen der Erythrocyten mit Ax/At) und nach zweimaliger Resuspension (1. bzw. 2. Hauptinkubation) der Erythrocyten in frischem Medium (Plasma / PBS-Puffer).

Es handelt sich um die Mittelwerte der Doppelbestimmungen.

			Erys/ Plasma= 2 : 1	Erys/ Plasma= 1 : 1	Erys/ Plasma= 1 : 2	Erys/ Puffer= 1 : 1
Vor- inkubation	Erys	At		11		
		Ax		33		
	Plasma	At		0		
		Ax		56		
1. Haupt- inkubation	Erys	At	10	6	6	14
		Ax	25	15	8	29
	Medium	At	3	5	2	7
		Ax	62	74	84	50
2. Haupt- inkubation	Erys	At	11	12	10	27
		Ax	13	9	11	22
	Medium	At	2	0	0	4
		Ax	74	79	79	47

Tabelle 91

Prozentualer Anteil von Amitriptylin und Amitriptylin-N-Oxid gemeinsam für Erythrocyten und Medium (Plasma / Puffer) (Ax + At in Erythrocyten + Medium = 100 %) nach der Vorinkubation (Beladen der Erythrocyten mit Ax/At) und nach zweimaliger Resuspension (1. bzw. 2. Hauptinkubation) der Erythrocyten in frischem Plasma / PBS-Puffer. Es handelt sich um die Mittelwerte der Doppelbestimmungen.

		Erys/ Plasma= 2 : 1	Erys/ Plasma= 1 : 1	Erys/ Plasma= 1 : 2	Erys/ Puffer= 1 : 1
Vorinkubation	Erys		44		
	Plasma		56		
1. Haupt- inkubation	Erys	35	21	14	43
	Medium	65	79	86	57
2. Haupt- inkubation	Erys	24	21	21	49
	Medium	76	79	79	51

Tabelle 92

Substanzverteilung zwischen Erythrocyten und Medium (Plasma / PBS-Puffer) nach der Vorinkubation (Beladen der Erythrocyten mit Ax/At) und nach zweimaliger Resuspension (1. bzw. 2. Hauptinkubation) der Erythrocyten in frischem Medium.

Die Werte dieser Tabelle errechnen sich aus Tab. 91 durch Addition der Prozentsätze für Amitriptylin plus derjenigen für Amitriptylin-N-Oxid in jedem Kompartiment.

		Erys/ Plasma= 2 : 1	Erys/ Plasma= 1 : 1	Erys/ Plasma= 1 : 2	Erys/ Puffer= 1 : 1
Vorinkubation	At		11		
	Ax		89		
1. Haupt- inkubation	At	13	11	8	21
	Ax	87	89	92	79
2. Haupt- inkubation	At	13	12	10	31
	Ax	87	88	90	69

Tabelle 93

Gesamtumsatz (At in Erythrocyten + Medium) in der Vorinkubation (Beladen der Erythrocyten mit Ax/At) und nach zweimaliger Resuspension (1. bzw. 2. Hauptinkubation) der Erythrocyten in frischen Medium (Plasma / PBS-Puffer).

Die Werte dieser Tabelle errechnen sich aus Tab. 91 durch Addition der beiden Prozentsätze für das Amitriptylin bzw. der beiden Prozentsätze für das Amitriptylin-N-Oxid in den beiden Kompartimenten.

Ergebnis-Tabellen zu :

20.) Zeit- und Temperaturabhängigkeit des Pharmakon-
transportes aus den Erythrocyten in das Medium.

Inkubationszeit	Kompartiment	Analyse	37 °C			0 °C		
			Vorinkubation	Vergleichs-inkubation	HAUPT-INKUBATION	Vergleichs-inkubation	HAUPT-INKUBATION	
2 Minuten	Erys	At Ax			332 292	639 459		401 369
	Plasma	At Ax			9 343	6 440		6 1.020
5 Minuten	Erys	At Ax			1.012 416	639 415		501 292
	Plasma	At Ax			9 731	8 658		9 1.970
30 Minuten	Erys	At Ax	346 455	187 116	386 380	748 516	79 66	381 333
	Plasma	At Ax	15 5.022	6 1.396	6 1.061	12 1.271	17 1.906	14 1.875
								15 1.931

Tabelle 94

Bei der Analyse gemessene absolute Mengen von Amitriptylin und Amitriptylin-N-Oxid in Nanogramm nach der Vorinkubation (Beladen der Erythrocyten mit Ax / At), nach der Vergleichsinkubation (Pharmakonstrom aus dem Plasma in die Erys) und nach Inkubationen von pharmakonbeladenen Erythrocyten (aus der Vorinkubation) mit frischem Plasma für verschiedene Inkubationszeiten (2, 5, 30 Minuten) und bei verschiedenen Temperaturen (0°C, 37°C).

Inkubations- zeit	Kompartiment	Analyse	37 ° C			0 ° C	
			Vor- inkub.	Ver- gleichs- inkub.	HAUPT- INKUB.	Ver- gleichs- inkub.	HAUPT- INKUB.
2 Minuten	Erys	At			56		50
		Ax			44		50
	Plasma	At			2		1
		Ax			98		99
5 Minuten	Erys	At			66		65
		Ax			34		35
	Plasma	At			1		0
		Ax			99		100
30 Minuten	Erys	At	46	57	55	51	59
		Ax	54	43	45	49	41
	Plasma	At	0	0	1	1	1
		Ax	100	100	99	99	99

Tabelle 95

Prozentualer Anteil von Amitriptylin und Amitriptylin-N-Oxid einzeln für jedes Kompartiment (Erythrocyten / Plasma) nach der Vorinkubation (Beladen der Erythrocyten mit Ax / At), nach der Vergleichsinkubation (Pharmakonstrom aus dem Plasma in die Erythrocyten) und nach Inkubationen von vorinkubierten (pharmakonbeladenen) Erythrocyten mit frischem Plasma für verschiedene Inkubationszeiten (2, 5, 30 Minuten) und bei verschiedenen Temperaturen (0°C, 37°C).

Es handelt sich um die Mittelwerte der Doppelbestimmungen.

Inkubations- zeit	Kompartiment	Analyse	37 ° C			0 ° C	
			Vor- inkub.	Ver- gleichs- inkub.	HAUPT- INKU- BATION	Ver- gleichs- inkub.	HAUPT- INKU- BATION
2 Minuten	Erys	At			38		19
		Ax			30		19
	Plasma	At			0		0
		Ax			32		62
5 Minuten	Erys	At			42		18
		Ax			22		10
	Plasma	At			0		0
		Ax			36		72
30 Minuten	Erys	At	9	8	25	3	19
		Ax	10	6	21	3	13
	Plasma	At	0	0	0	0	0
		Ax	81	86	54	94	68

Tabelle 96

Prozentualer Anteil von Amitriptylin und Amitriptylin-N-Oxid gemeinsam für Erythrocyten und Plasma nach der Vorinkubation (Beladen der Erythrocyten mit Ax / At), nach der Vergleichsinkubation (Pharmakonstrom aus dem Plasma in die Erythrocyten) und nach Inkubationen von vorinkubierten (pharmakonbeladenen) Erythrocyten mit frischem Plasma für verschiedene Inkubationszeiten (2, 5, 30 Minuten) und bei verschiedenen Temperaturen (0°C, 37°C).

Es handelt sich um die Mittelwerte der Doppelbestimmungen.

Inkubations- zeit	Kompartiment	37 ° C			0 ° C	
		Vor- inkub.	Ver- gleichs- inkub.	HAUPT- INKU- BATION	Ver- gleichs- inkub.	HAUPT- INKU- BATION
2 Minuten	Erys			68		38
	Plasma			32		62
5 Minuten	Erys			64		28
	Plasma			36		72
30 Minuten	Erys	19	14	46	6	32
	Plasma	81	86	54	94	68

Tabelle 97

Substanzverteilung zwischen Erythrocyten und Plasma nach der Vorinkubation, der Vergleichsinkubation und den Inkubationen vorinkubierter (pharmakonbeladener) Erythrocyten mit frischem Plasma für verschiedene Inkubationszeiten und bei verschiedenen Temperaturen.

Die Werte dieser Tabelle errechnen sich aus Tab. 96 durch Addition der Prozentsätze für das Amitriptylin plus derjenigen für das Amitriptylin-N-Oxid in jedem Kompartiment.

Inkubations- zeit	Analyse	37 ° C			0 ° C	
		Vor- inkub.	Ver- gleichs- inkub.	HAUPT- INKU- BATION	Ver- gleichs- inkub.	HAUPT- INKU- BATION
2 Minuten	At			38		19
	Ax			62		81
5 Minuten	At			42		18
	Ax			58		82
30 Minuten	At	9	8	25	3	19
	Ax	91	92	75	97	81

Tabelle 98

Gesamtumsatz (At in Erythrocyten + Plasma) nach der Vorinkubation, der Vergleichsinkubation und den Inkubationen vorinkubierter (pharmakonbeladener) Erythrocyten mit frischem Plasma für verschiedene Inkubationszeiten und bei verschiedenen Temperaturen.

Die Werte dieser Tabelle errechnen sich aus Tab. 96 durch Addition der beiden Prozentsätze für das Amitriptylin, bzw. der beiden Prozentsätze für das Amitriptylin-N-Oxid aus beiden Kompartimenten.

Ergebnis-Tabellen zu :

21.) Die Herkunft des Amitriptylins im Plasma nach Inkubationen von Amitriptylin-N-Oxid.

Plasma + 5.000 ng Ax	At Ax	30 6.011	10 2.161	9 2.241			
Volblut + 5.000 ng Ax	Plasma + LX	40 1.413	21 1.622	11 1.445	33 1.404	9 1.444	10 1.325
	Plasma + Lly	10 1.376	12 1.223	17 1.300	22 1.377	13 1.471	14 1.379
Volblut ohne Pharmakon vorinkubiert	Plasma + 5 ng Ax	20 2.059	11 2.280	13 2.339	10 1.944	11 2.195	9 2.252
	Plasma + 4 ng Ax	14 1.969	14 2.320	14 2.228	19 3.665	7 1.421	9 1.806

Tabelle 99

Bei der Analyse gemessene absolute Mengen an Amitriptylin und Amitriptylin-N-Oxid im Plasma in Nanogramm nach Inkubationen von Plasma, welches a) sofort nach der Blutabnahme b) zusammen mit Erythrocyten c) nach einer Inkubation mit Erythrocyten aber ohne Pharmakon mit Amitriptylin-N-Oxid inkubiert worden war.

Plasma + 5.000 ng Ax		At	0,5 99,5	0,4 99,6				Mittelwerte des At-Anteils in %	
		Ax						0,4	0,4
Volblut + 5.000 ng Ax	Plasma + LLX	At Ax	2,7 97,3	1,3 98,7	0,8 99,2	2,3 97,7	0,6 99,4	0,7 99,3	1,4
	Plasma + LLY	At Ax	0,7 99,3	0,9 99,1	1,3 98,7	1,6 98,4	0,9 99,1	1,0 99,0	1,1
Volblut ohne Pharmakon vorinkubiert	Plasma + 51ngAx	At Ax	1,0 99,0	0,5 99,5	0,5 99,5	0,5 99,5	0,5 99,5	0,4 99,6	0,6
	Plasma + 41ngAx	At Ax	0,7 99,3	0,6 99,4	0,6 99,4	0,5 99,5	0,5 99,5	0,5 99,5	0,6
									1,2
									0,6

Tabelle 100
Prozentualer Anteil von Amitriptylin und seinem N-Oxid in Plasma, welches
a) sofort nach der Blutabnahme b) zusammen mit Erythrocyten und
c) nach einer vorhergehenden Inkubation zusammen mit Erythrocyten aber ohne
Pharmakon mit Amitriptylin-N-Oxid inkubiert worden war.

Ergebnisse der Erythrocyten-Analysen von Versuch 21.) :

At	852	795
Ax	270	387

absolut gemessene Mengen
in Nanogramm

Tabelle 101

			Mittel- wert
At	76	67	72
Ax	24	33	28

Prozentualer Anteil
von At und Ax für des
Kompartiment
Erythrocyten einzeln

Tabelle 102

Erys	At	21
	Ax	8
Plasma	At	1
	Ax	70

Prozentualer Anteil von Ax und At
für Erythrocyten und Plasma
gemeinsam

(At + Ax in Erys + Plasma = 100 %)

Tabelle 103

Erys	29
Plasma	71

Substanzverteilung

Tabelle 104

At	22
Ax	78

Gesamtumsatz ,

Tabelle 105

L E B E N S L A U F

Am 3. Juni 1958 wurde ich in Altenmünster, Kreis Wertingen (heute Kreis Augsburg) als Sohn des Steuerbeamten Alois Sassim und seiner Ehefrau Hedwig geboren und wohne seit Ende 1958 in Augsburg.

Dort besuchte ich von 1964 bis 1968 die Wittelsbacher Volksschule und ab 1968 das Jakob-Fugger-Gymnasium, wo ich im Juni 1977 das Abitur machte.

Im Wintersemester 1977/78 begann ich mein Medizinstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität München. Im November 1983 bestand ich den Dritten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung und erhielt die Approbation als Arzt.

Von Mai bis September 1984 arbeitete ich als Assistenzarzt an der Psychiatrischen Klinik der Universität München und bin seit Oktober 1984 am Bezirkskrankenhaus Regensburg beschäftigt. Nach einem halben Jahr ist meine Rückkehr an die Psychiatrische Klinik der Universität München vorgesehen.

Norbert Sassim

